

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mima Bašić
Utjecaj stresa endoplazmatskog retikuluma na ekspresiju gena
citokina IL-1 β , IL-6, IL-10 i TGF- β u jetri miša
Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Mirele Baus Lončar. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Najiskrenije se zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. Mireli Baus Lončar, za vodstvo i stručne savjete, strpljenje i razumijevanje pokazano prilikom izrade diplomskog rada. Također je kroz cijeli proces uz mene bila doktorandica Kate Šešelja, kojoj sam jako zahvalna na sva odgovorena pitanja i podpitanja te srdačnost.

Na kraju, veliko hvala mojim zvijezdama vodiljama, roditeljima, i prijateljima na безусловnoj ljubavi i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ STRESA ENDOPLAZMATSKOG RETIKULUMA NA EKSPRESIJU CITOKINA IL-1 β , IL-6, IL-10 I TGF- β U JETRI MIŠA

Mima Bašić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stres endoplazmatskog retikuluma (ER) stanje je narušene homeostaze, okarakteriziran nakupljanjem nesmotanih ili pogrešno smotanih proteina. Tada se pokreće adaptivni mehanizam stanice nazvan odgovor nesmotanih proteina koji sekod sisavaca sastoji od tri glavna signalna puta. Njihova aktivacija rezultira promjenama na transkripcijskoj i translacijskoj razini u svrhu uspostavljanja normalne funkcije ER-a. Kada je stres perzistentan i nepopravljiv, odgovor nesmotanih proteina pokreće apoptozu stanice. Odgovor nesmotanih proteina može aktivirati ključni transkripcijski faktor u modulaciji upalnih odgovora, NF- κ B, povećati ekspresiju proupalnih citokina i time upalne procese. Danas se intenzivno istražuje uloga stresa ER-a u patogenezi raznih bolesti. Kako bi se ustanovilo na koji način stres ER-a mijenja ekspresiju gena *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB* u tkivu jetre miševa, upoređena je njihova relativna ekspresija u uvjetima stresa ER-a, kod miševa tretiranih tunikamicinom, s relativnom ekspresijom u normalnim fiziološkim uvjetima u kontrolnoj grupi miševa. U tu svrhu izolirana je RNA iz tkiva jetre miševa, reverznom transkripcijom prevedena u cDNA te je analizirana metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Analizom rezultata metode qPCR računalnim programom REST ustanovljeno je da stres ER-a uzrokuje statistički značajno povećanje ekspresije *IL1B* i *IL6* te smanjenje ekspresije protuupalnog *IL10* u jetri miša.

(40 stranica, 7 slika, 6 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: stres endoplazmatskog retikuluma, UPR, upala, jetra, qPCR

Voditelj: dr.sc. Mirela Baus Lončar

Suvoditelj: dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Ana Galov, izv. prof.

dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija, izv. prof.

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 6. 6. 2019. god.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University in Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

THE INFLUENCE OF ENDOPLASMIC-RETICULUM STRESS ON CYTOKINE IL-1 β , IL-6, IL-10 AND TGF- β EXPRESSION IN MOUSE LIVER

Mima Bašić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Endoplasmic-reticulum stress is a state of disrupted ER homeostasis, characterized by accumulation of unfolded or misfolded proteins. ER activates adaptive mechanism of cells called unfolded protein response which is comprised of three major signal pathways in mammals. Their activation results in changes on transcriptional and translational level to restore normal ER functions. In case of persistent and irremediable ER stress, unfolded protein response initiates cell apoptosis. Unfolded protein response can activate crucial transcription factor of inflammation, NF- κ B, and increase expression of proinflammatory cytokines and processes. Roles of ER stress in pathology of different diseases are being intensively investigated today. To determine how ER stress changes expression of *IL1B*, *IL6*, *IL10* and *TGFB* genes in mouse liver, their expression under conditions of ER stress in mice treated with tunicamycin was compared to their expression in normal physiological conditions in control group of mice. For that purpose RNA from mouse liver tissue was isolated, transcribed by reverse transcription into cDNA and analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Results obtained by qPCR were analysed by REST software. The results showed that ER stress causes statistically significant increase of *IL1B* and *IL6* expression and statistically significant decrease of *IL10* expression.

(40 pages, 7 pictures, 6 tables, 56 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: endoplasmic-reticulum stress, UPR, inflammation, liver, qPCR

Supervisor: Dr. Mirela Baus Lončar

Cosupervisor: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Renata Matonićkin Kepčija, Assoc. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 6. 6. 2019. god.

Popis kratica

AP1 – aktivator protein 1, od engl. *activator protein 1*

ATF6 – aktivacijski transkripcijski faktor 6, od engl. *activation transcription factor 6*

β 2M – β 2 mikroglobulin, od engl. *beta-2 microglobulin*

β -act – β -aktin, od engl. *beta-actin*

BiP – vezujući protein imunoglobulina, od engl. *binding immunoglobulin protein*

C/EBP – vezujući protein CCATT/pojačivača, od engl. *CCATT/ enhancer binding protein*

c-MAF – faktor c-mišićnoaponeurotičnog fibrosarkoma, od engl. *c-musculoaponeurotic fibrosarcoma factor*

cDNA – komplementarna DNA, od engl. *complementary DNA*

CHOP – protein homologan CCAAT-pojačivač-vezujućem proteinu, od engl. *CCAAT enhancer-binding protein homologous protein*

CREB – vezujući protein cAMP-elementa odgovora, od engl. *cAMP response element binding protein*

CRP – C-reaktivni protein, od engl. *C-reactive protein*

CTL – citotoksični limfociti, od engl. *cytotoxic lymphocytes*

DAMP – molekularni uzorci povezani sa ozljedom, od engl. *damage associated molecular*

ECM – ekstracelularni matriks, od engl. *extracellular matrix patterns*

eIF2 α – α podjedinica eukariotskog faktora inicijacije translacije 2, od engl. *eucaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha*

ER – endoplazmatski retikulum, od engl. *endoplasmic reticulum*

ERAD – degradacija povezana sa ER-om, od engl. *ER-associated degradation*

ERO1 α – oksidoreduktaza 1 α endoplazmatskog retikuluma, od engl. *endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha*

GADD34 – protein kojeg inducira zastoj rasta i oštećenje DNA 34, od engl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*

gp130 – glikoprotein 130, od engl. *glikoprotein 130*

GSK-3 β – kinaza glikogen sintaze-3 β , od engl. *glycogen synthase kinase-3 beta*

HNRPNA1 – heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A1, od engl. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1*

HSC – stelatne stanice jetre, od engl. *hepatic stellate cells*

I κ B – inhibitor κ B, od engl. *κ B inhibitor*

IKK – I κ B kinaza, od engl. *I κ B kinase*

IL-1 β – interleukin 1 β , od engl. *interleukin 1 beta*

IL-6 – interleukin 6, od engl. *interleukin 6*

IL-10 – interleukin 10, od engl. *interleukin 10*

IRE1- α – inozitol-zahtijevajući enzim 1 α , od engl. *inositol-requiring enzyme 1 alpha*

JAK1 – Janus kinaza 1, od engl. *Janus kinase 1*

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza, *c-Jun N-terminal kinase*

LAP – peptid povezan sa latentnošću, engl. *latency-associated peptide*

LPS – lipopolisaharid, od engl. *lipopolysaccharide*

MAPK – protein-kinaza koju aktiviraju mitogeni, od engl. *mitogen-activated protein kinase*

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti, od engl. *major histocompatibility complex*

mRNA – glasnička RNA, od engl. *messenger RNA*

MYD-88 – protein primarnog odgovora mijeloidne diferencijacije 88, od engl. *myeloid*

NAFLD – nealkoholna bolest masne jetre, od engl. *nonalcoholic fatty liver disease*

NASH – nealkoholni steatohepatitis, od engl. *nonalcoholic steatohepatitis differentiation primary response protein 88*

NF- κ B – nuklearni faktor κ B, od engl. *nuclear factor κ B*

NLR – NOD-sličan receptor, od engl. *NOD-like receptor*

NO – dušik-monoksid, od engl. *nitric monoxide*

PAA – poliakrilamid, engl. *polyacrylamide*

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza, engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*

PERK – protein kinaza R (PKR)-slična kinaza endoplazmatskog retikuluma, od engl. *protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*

PGE2 – prostaglandin E2, od engl. *prostaglandin E2*

PI3 – fosfatidilinozitol 3, od engl. *phosphoinositide 3*

PI3K – fosfatidilinozitol 3 kinaza, od engl. *phosphoinositide 3 kinase*

PQT – od engl. *Primer Quest Tool*

PRR – receptori koji prepoznaju uzorke, od engl. *pattern recognition receptors*

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*

RIDD – regulirani raspad ovisan o IRE1, od engl. *regulated IRE1-dependent decay*

ROS – reaktivne kisikove vrste, od engl. *reactive oxygen species*

SAP – serumski amiloidni protein, od engl. *serum amyloid protein*

SEC – sinusoidne endotelne stanice, od engl. *sinusoidal endothelial cells*

Sp – protein specifičnosti, od engl. *specificity protein*

STAT – signalni transducere i aktivatori transkripcije, od engl. *signaltransducers and activators of transcription*

TGFβ – transformirajući faktor rasta β, od engl. *transforming growth factor beta*

TLR – Toll-u sličan receptor, od engl. *Toll-like receptor*

T_m – temperatura taljenja, od engl. *melting temperature*

TRAF2 – faktor povezan sa receptorom TNF-α 2, od engl. *TNF-α receptor associated factor*

2

TXNIP – protein u interakciji sa tioredoksinom, od engl. *thioredoxin-interacting protein*

UPR – odgovor nesmotanih proteina, od engl. *unfolded protein response*

XBP1 – X-box-vezujući protein 1, od engl. *X-box binding protein 1*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Stres endoplazmatskog retikuluma	1
1.2. Citokini.....	4
1.2.1. Interleukin 1 β	5
1.2.2. Interleukin 6	6
1.2.3. Interleukin 10	7
1.2.4. Transformirajući faktor rasta β	8
1.3. Povezanost stresa ER-a, upale i patofiziologije bolesti jetre	9
1.4. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR)	11
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR)	15
3.1.1. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	16
3.1.2. Analiza efikasnosti amplifikacije	17
3.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena citokina IL-1β, IL-6, IL-10 i TGF-β. 18	
3.2.1. Uzorci tkiva.....	18
3.4.2. Izolacija RNA	18
3.4.3.Reverzna transkripcija.....	20
3.4.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)	21
3.4.5. Računalna obrada podataka	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Rezultati optimizacije metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom	
(qPCR).....	23
4.2. Rezultati relativne kvantifikacije ekspresije gena citokina IL-1β, IL-6, IL-10 i	
TGF-β	25
5. RASPRAVA	28
6. ZAKLJUČAK	34
7. POPIS LITERATURE.....	35
8. ŽIVOTOPIS	40

1. UVOD

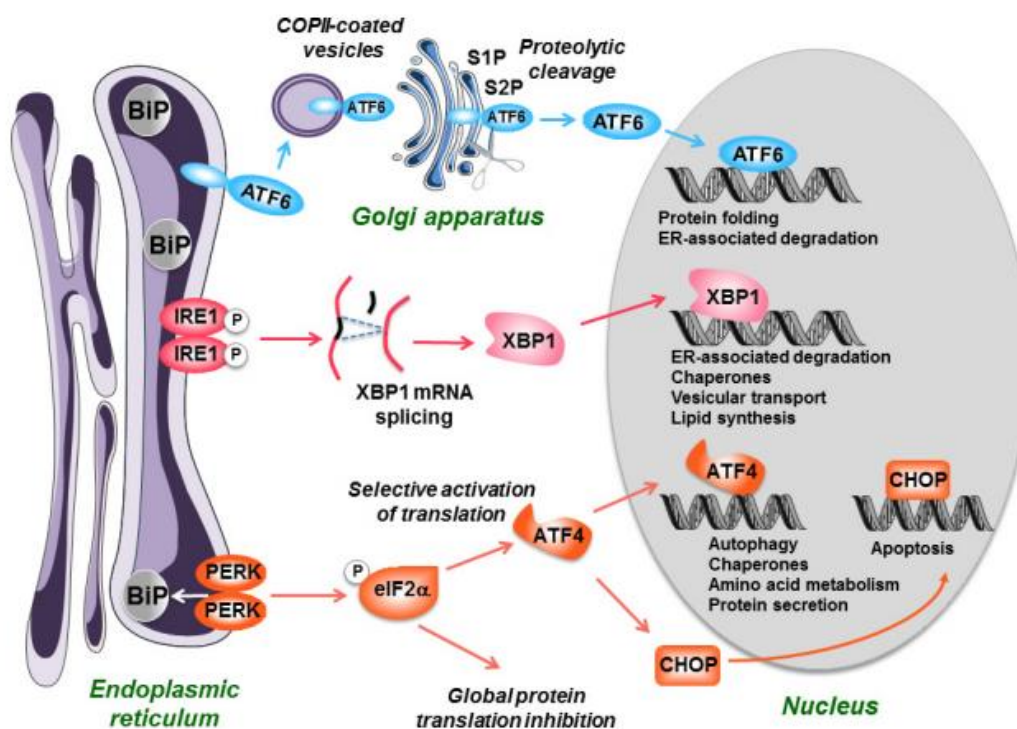
1.1. Stres endoplazmatskog retikuluma

Endoplazmatski retikulum (ER) je organel koji regulira homeostazu proteina pravilnim smatanjem, modifikacijom, transportom i degradacijom transmembranskih, sekretornih i proteina ER-a. Pravilno smatanje proteina pomažu šaperoni, a u modificiranje su uključeni enzimi iz skupina izomeraza, transferaza, oksidoreduktaza. ER je također uključen u održavanje homeostaze Ca^{2+} koji je neophodan za aktivnost šaperona, te u metabolizam glukoze i lipida. Različiti endogeni i egzogeni faktori koji uzrokuju pojačanu sintezu proteina i poremećaje njihove degradacije, kao što susuficit ili deficit nutrijenata, hipoksija, reaktivne kisikove vrste te upalne reakcije, mogu dovesti do narušavanja pravilnog rada ovog organela, odnosno smanjenja efikasnosti smatanja proteina u pravilne, funkcionalne konformacije. Takvi nesmotani ili pogrešno smotani proteini se ne mogu pakirati u transportne vezikule i nastaviti put prema svom odredištu pa se nakupljaju u njegovom lumenu i izazivaju stres ER-a. Tada se aktivira odgovor nesmotanih proteina (engl. *unfolded protein response*, UPR), adaptivni mehanizam kojim stanica nastoji smanjiti izazvani stres i uspostaviti homeostazu endoplazmatskog retikuluma (Alberts i sur. 2008). UPR čine signalni putevi kojima se prikupljaju informacije iz lumena ER-a i prenose u citoplazmu i jezgru stanice kako bi se povećao kapacitet endoplazmatskog retikuluma za smatanje proteina. Promjene su najvećim dijelom transkripcijske, gdje dolazi do povećanja ekspresije gena koji kodiraju strukturne proteine membrane ER-a i proteine uključene u pravilno smatanje, transport, degradaciju i sekreciju proteina. UPR uzrokuje proces degradacije proteina povezanim s ER-om (engl. *ER-associated degradation*, ERAD) kojim se nesmotani proteini iz lumena ER-a prenose u citosol i razgrađuju u proteasomima. Istovremeno se smanjuje translacija proteina, njihov transport u lumen ER-a, smanjujući na taj način trenutačno opterećenje organele. Ukoliko se odgovorom nesmotanih proteina ne uspiju ukloniti nefunkcionalni proteini iz lumena ER-a, UPR odgovor će pokrenuti programiranu staničnu smrt kako bi se uklonile stanice koje nisu sposobne pravilno dorađivati proteine i koje su kao takve potencijalno opasne za organizam (Walter i Ron 2011).

U stanicama kvasca je prvotno opisan odgovor UPR koji se sastoji od jednog signalnog puta, Ire1. Usložnjavanjem organizama u konačnici su se kod kralješnjaka izdiferencirala tri kompleksna signalna puta. Svrha postojanja različitih grana UPR-a koje se sastoje od velikog broja komponenti jeste optimalna prilagodba odgovora različitim

zahtjevima specijaliziranih stanica koje su izložene različitim mikrookolišima. Značaj odgovora UPR je posebno naglašen kod sekretornih stanica poput hepatocita, β stanica gušterače, žlijezda slinovnica, plazma stanica. Budući da mnoge molekularne komponentne dijeli s drugim signalnim putevima, UPR pored primarne funkcije smatanja proteina pod fiziološkim i patološkim stresom sudjeluje u modulaciji metabolizma lipida i kolesterola, održavanju energetske homeostaze, staničnoj diferencijaciji, upalnim procesima (Rutkowski i Hedge 2010; Hetz i sur. 2012).

Inicijatori tri signalna puta UPR-a (Slika 1) su različite senzorne transmembranske molekule ER-a: aktivacijski transkripcijski faktor 6 (engl. *activation transcription factor6*, ATF6), kinaza slična protein kinazi R ER-a (engl. *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*, PERK) i enzim IRE1 (engl. *inositol-requireing enzyme*, IRE1). IRE1 i ATF6 su prisutni u α i β izoformama što dodatno doprinosi kompleksnosti odgovora. Pretpostavlja se da su za luminalne domene ATF-a i PERK-a u normalnim uvjetima vezane molekule šaperona BiP (engl. *binding immunoglobuline protein*). Kada se poremeti homeostaza ER-a, BiP se veže za nastale nesmotane proteine, a njegovo odvajanje od ATF-6 i PERK-a će uzrokovati njihovu aktivaciju. Smatra se da se, za razliku od ATF6 i PERK-a, molekule IRE1 aktiviraju direktnom interakcijom njihove luminalne domene s nesmotanim proteinima. Sva tri puta se razlikuju po načinu signalne transdukcije (Zhang i Kaufman 2008; Walter i Ron 2011).



Slika 1. Tri glavna signalna puta UPR odgovora (preuzeto iz Foulle i Fromenti 2016)

Po odvajanju BiP-a, ATF6 se pakira u transportne vezikule koje odlaze do Golgijevog aparata u kojem se proteolitički cijepa njegov citosolni fragment (ATF6f) od transmembranske i luminalne domene. ATF6f je transkripcijski faktor koji odlazi u jezgru kako bi aktivirao ciljne gene, a to su geni koji kodiraju enzime potrebne za smatanje proteina (šaperon BiP, protein disulfid izomeraza, šaperon GRP94) te proteine uključene u put ERAD. Osim toga ATF6f pojačava i transkripciju gena *XBPI* (Zhang i Kaufman 2008; Walter i Ron 2011).

Aktivacija molekula PERKse sastoji od homodimerizacije i autofosforilacije što dalje omogućava fosforilaciju α podjedinice faktora inicijacije translacije (engl. *eucaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha*, eIF2 α) koje se nalaze u citosolu. Fosforilirane molekule eIF2 ne mogu graditi translacijske komplekse pa je ovo način na koji se smanjuje sinteza proteina i njihov unos u lumen ER-a. S druge strane na ovaj način je omogućeno prepisivanje posebnih glasničkih RNA koje imaju manji zahtjev za eIF2 faktorom i među njima je mRNA koja kodira aktivirajući transkripcijski faktor 4 (ATF4). Ciljni UPR geni transkripcijskog faktora ATF4 su geni čiji su produkti uključeni u metabolizam aminokiselina, redoks procese te u apoptozu izazvanu stresom ER-a (Yin Liu i Kaufman 2003). Važan ciljni gen ATF4 je transkripcijski faktor *CHOP* (engl. *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*) s kojim formira heterodimere i koji povećavaju ekspresiju *GADD34* (engl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*). *GADD34* je neophodan za defosforilaciju eIF2 α čime se ponovno omogućava translacija proteina i preživljavanje akutnog stresa. Pri dužem stresu ER-a *CHOP* također povećava ekspresiju proapoptotskih gena *DR5*, *TRB3*, *Bim*, *PUMA*, a apoptozu potiče i povećanje translacije proteina i potrošnje ATP-a posredovano *GADD34*. Dodatno *CHOP* vodi ka oksidativnom stresu, mitohondrijskoj disfunkciji i apoptozi preko aktivacije oksidoreduktaze 1 α ER-a (engl. *endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha*, ERO1 α) (Wang i Kaufman 2016).

Budući da je prisutan kod svih eukariotskih organizama, signalni put IRE1 je najbolje proučen. Interakcija luminalne domene IRE1 s nesmotanim proteinima dovodi do aktivacije ove senzorne molekule čija citosolna domena posjeduje kinaznu i ribonukleaznu aktivnost. Molekule IRE1, kao i PERK, autofosforiliraju se i oligomeriziraju, čime se aktivira ribonukleazni dio molekule koji zatim vrši prekrajanje supstrata, a to je mRNA transkripcijskog faktora *XBPI* (engl. *X-box binding protein 1*, *XBPI*). Produkt prekrajanja, *XBPIs* migrira u jezgru i pojačava ekspresiju ciljnih gena UPR-a koji imaju funkciju u regulaciji biosinteze lipida, smatanju i sekreciji proteina, te putu ERAD. IRE1 također

smanjuje translaciju proteina i na taj način pridonosi smanjenju opterećenja ER-a. To se postiže aktivacijom reguliranog raspada ovisnog o IRE1 (eng. *regulated IRE1-dependent decay*, RIDD) u kojem senzori IRE1 pri dugotrajnijem stresu ER-a razgrađuju razne mRNA molekule (Hetz 2012).

UPR i njegovi signalni putevi su važni za optimalnu proizvodnju protuupalnih citokina u okviru urođene imunosti. Kod makrofaga tretiranih bakterijskim endotoksinom lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) u odsustvu stresa ER-a, aktivacija receptora urođene imunosti TLR2 i 4 (engl. *Toll-like receptor*) pojačava fosforilaciju IRE1 α i prekrajanja XBP1. Sam stres ER-a uzrokuje nisku sintezu proupalnih citokina, a najjača reakcija se javlja kod makrofaga koji su tretirani LPS-om u prisustvu stresa ER-a (Martinon i Glimcher 2011).

Načelno sve tri grane UPR-a mogu inicirati ili pojačati upalne reakcije aktivacijom glavnih proupalnih transkripcijskih faktora nuklearnog faktora κ B (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- κ B) i aktivator proteina 1 (engl. *activator protein 1*, AP1) različitim mehanizmima. Uzrokujući ovim putem povećanu ekspresiju proupalnih citokina i modulaciju imunskih procesa, signalni putevi UPR se danas proučavaju u kontekstu razvoja raznih neurodegenerativnih, metaboličkih, upalnih bolesti te tumora (Grootjans i sur. 2016).

1.2. Citokini

Citokini su primarno definirani kao topivi proteini pomoću kojih komuniciraju stanice imunskog sustava. Međutim, mogućnost sinteze, sekrecije citokina i odgovora na njih leukociti dijele s velikim brojem drugih neimunskih stanica. Na ciljne stanice najčešće djeluju autokrino i parakrino, a neki citokini i endokrino. Vezanjem na receptore aktiviraju nizvodne signalne puteve u kojim učestvuju specifični adaptorski proteini i enzimi. Rezultat je promjena transkripcijskog programa ciljne stanice, aktivacija ili inhibicija određenih enzima, indukcija ekspresije adhezivnih molekula i kemokinskih receptora. Citokini moduliraju upalne i imunosne reakcije stimuliranjem ili inhibicijom proliferacije, diferencijacije i aktivacije leukocita (Rich i sur. 2008). Odlike citokina su pleiotropizam (mogućnost djelovanja na više tipova stanica i posljedično ispoljavanja više različitih efekata) i redundancija (različiti citokini mogu imati slične efekte). Mogu djelovati sinergistički s drugim citokinima, tj. inducirati ili pojačati njihov učinak, ali i biti u antagonističkom odnosu. Nastanak velikog broja citokina i njihovih receptora se odvijao paralelno s razvojem različitih efektorskih funkcija leukocita (Murphy 2012). Citokini su okupljeni u šest porodica:

porodica interleukina 1, porodica citokina klase I (hematopoetinska porodica), porodica citokina klase II (interferonska porodica), porodica faktoratumorske nekroze, porodica interleukina 17 i porodica kemokina (Owen i sur. 2013). Dodatno, izdvaja se i porodica transformirajućeg faktora rasta.

1.2.1. Interleukin1 β

Interleukin 1 β (engl. *interleukin-1 beta*, IL-1 β) je član porodice interleukina 1. Većina članova porodice ima proupalno djelovanje što postižu moduliranjem procesa urođene kao i adaptivne imunosti na raznovrsne načine. IL-1 β je jedan od prvih citokina koji se secernira kao odgovor na infekciju ili oštećenje i djeluje sistemski i lokalno. Poticanjem ekspresije gena koji kodiraju određene enzime, uzrokuje sintezu i sekreciju aktivnih supstanci, prostaglandina E2 (engl. *prostaglandin E2*, PGE2), dušičnog monoksida (engl. *nitric monoxide*, NO), i time vazodilataciju na mjestu infekcije ili oštećenja. IL-1 β uzrokuje povećanu ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim stanicama kao i sekreciju kemokina omogućavajući migraciju imunskih stanica iz krvi u upaljeno tkivo. Sistemski uzrokuje povećanje tjelesne temperature putem djelovanja PGE2 na hipotalamus, regulira sintezu IL-6 i time indirektno sintezu i sekreciju proteina akutne faze koji pospješuju odgovor urođenog i adaptivnog imunskog sustava. Primarno ga proizvode i izlučuju monociti, makrofagi i dendritičke stanice aktivirane mikrobnim produktima preko receptora sličnog Toll-u (TLR), receptorima sličnim molekuli NOD (engl. *NOD-like receptor*, NLR) ili upalnim citokinima (IL-1 β , TNF- α), a sam IL-1 β autokrino pojačava vlastitu ekspresiju. Prepisivanjem gena smještenog na drugom kromosomu i prevođenjem njegove mRNA u citosolu nastaje pro-IL-1 β koji nije biološki aktivan (Dinarello 2009; Owen i sur. 2013). Funkciju stvaranja zrele forme IL-1 β ima kaspaza 1 koja je također u stanici prisutna u obliku neaktivne prokaspaze 1. Za aktivaciju prokaspaze 1 potrebno je sklapanje multiproteinskog kompleksa, inflammasoma. Inflammasome grade adaptorski proteini, intracelularni imunski receptor NLR i prokaspaza 1. Sklapanje inflammasoma aktiviraju ekstracelularni ATP (kojeg pri upalama otpuštaju monociti i makrofagi), bakterijski, virusni i fungalni antigeni, molekularni uzorci povezani s ozljedom (engl. *molecular patterns associated with damage*, DAMP), reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Owen i sur. 2013). Zreli IL-1 β može napustiti stanice na više načina uključujući egzocitozu sekretornih vezikula te proteinske transportere. Također je moguće ekstracelularno prevođenje pro-IL-1 β u njegovu zrelu formu pod djelovanjem enzima proteaze i elastaze neutrofila i himaze mastocita. Mutacije proteina koji grade inflammasom

rezultiraju njegovom konstantnom aktivacijom te spontanom sekrecijom IL-1 β . Takve mutacije su najčešći uzrok autoupalnih bolesti za koje se primjenjuju terapeutici koji suzbijaju efekte IL-1 β (Dinarello 2009; Gabay i sur. 2010).

1.2.2. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) je proupalni citokin koji se poput IL-1 β među prvima sintetizira i izlučuje pri infekcijama i ozljedama. Spada u porodicu citokina klase I i među njegovim brojnim funkcijama najznačajnije su one u posredovanju sinteze proteina akutne faze, tranzicije iz urođene u adaptivnu imunost, te poticanje regenerativnih procesa jetre. IL-6 proizvode endotelne stanice, fibroblasti, monociti, makrofagi i neki T-limfociti u odgovoru na signale porijeklom od receptora PRR (TLR-ova, NLR-ova), proupalnih citokina IL-1 β i TNF- α , pri čemu dolazi do aktivacije NF- κ B puta. Studija Norris i sur. (2016) je pokazala da i hepatociti imaju sposobnost sinteze IL-6 i da je pored NF- κ B puta, u sintezu ovog citokina u njima vjerovatno uključen još jedan, zasad nepoznat signalni put. Receptor za IL-6 (IL-6R) nalazi se samo na pojedinim tipovima stanica (hepatocitima, hepatičnim stelatnim stanicama, neutrofilima, makrofazima i pojedinim tipovima T limfocita). Kako IL-6R ne posjeduje domen za sprovođenje signala tu ulogu obavlja transmembranski glikoprotein 130 (engl. *glikoprotein 130*, gp130). Vezanjem IL-6 za IL-6R, dvije molekule gp130 se pripajaju uz nastali kompleks i dimeriziraju čime započinje aktivacija nizvodnog signalnog puta. Proces kojim su ciljne stanice aktivirane na prethodno opisan način naziva se klasično signaliziranje. Zahvaljujući prisutnosti gp130 na površini svih stanica u organizmu, te mogućnošću proteolitičkog cijepanja i otpuštanja IL-6 sa površine stanica u ekstracelularni prostor, uveliko je proširen raspon tipova stanica na čiju funkciju IL-6 može djelovati. Mehanizam kojim se aktiviraju ciljne stanice vezanjem kompleksa topivog IL-6R (sIL-6R) i IL-6 za njihov membranski gp130 naziva se trans-signaliziranje (Scheller i sur. 2011; Schmidt-Arras i Rose-John 2016). Na mjestu infekcije ili ozljede tkiva rezidentne imunosne stanice proizvode IL-6 koji krvlju dopire do jetre i klasičnim signaliziranjem uzrokuje proizvodnju i sekreciju proteina akutne faze. Neutrofili po dospjeću u ciljno tkivo brzo odumiru prije čega sintetiziraju sIL-6 koji formira kompleks s IL-6 i aktivira endotelne stanice trans-signaliziranjem. Time se smanjuje ekspresija neutrofilnih kemokina, a pojačava ekspresija kemokina koji privlače makrofage i T-limfocite kao i adhezivnih molekula koje omogućuju njihovu migraciju iz krvi u ciljno tkivo (Scheller i sur. 2011). Trans-signaliziranje je odgovorno i za povećanje regenerativnih stanica prilikom ozljede jetre. IL-6 je uključen i u

diferencijaciju B limfocita u plazma stanice, CD8⁺ T limfocita u citotoksične limfocite te u diferencijaciji T limfocita. Inhibira razvoj T_{reg} limfocita posredovan TGF-β, dok u kombinaciji s istim potiče razvoj T_H17 limfocita koje su uključene u autoimune procese i kronične upalne bolesti. U koštanoj srži stimulira sazrijevanje megakariocita i otpuštanje trombocita u krvotok, a sudjeluje i u homeostazi kosti kao faktor koji potiče diferencijaciju osteoklasta (Tanaka i sur. 2014; Schmidt-Arras i Rose-John 2016).

1.2.3. Interleukin 10

Pripadnik porodice interferona, interleukin 10 (IL-10) je važan imunomodulatorni citokin. Kroz svoje protuupalno djelovanje regulira jačinu urođenog i adaptivnog imunskog odgovora na razne infekcije, sprječavajući oštećenje tkiva agresivnim medijatorima kojim se imunosne stanice bore protiv patogenih mikroorganizama. Usljed njegova nedostatka produljuju se upalne i alergijske reakcije, te dolazi do razvoja autoimunskih procesa. Humani i mišji gen *IL10* nalazi se na prvom kromosomu u lokusu koji je povezan sa osjetljivošću na autoimunosne bolesti (Iyer i Cheng 2012). Prvotno je opisan kao citokin pomoćničkih T_H2 limfocita. Glavni izvori IL-10 su monociti i makrofagi koji su ujedno i njegov primarni cilj, zatim dendritičke stanice i pomoćnički T limfociti. Do danas je utvrđeno da mogućnost njegove sinteze i sekrecije posjeduju gotovo sve stanice urođene i adaptivne imunosti što potvrđuje njegovu ulogu u regulaciji raznovrsnih imunskih odgovora. U makrofazima i dendritičkim stanicama signali porijeklom od PRR-ova ili proupalnih citokina aktiviraju put ovisan o MYD-88 (engl. *myeloid differentiation primary response protein 88*) koji potiče aktivaciju puteva NF-κB i mitogenom aktiviranu protein kinazu (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) čime se potiče ekspresija proupalnih citokina (IL-1, IL-6 i TNF-α) i IL-10. Za optimalnu proizvodnju IL-10 potrebna je aktivacija signalnog puta sinteze i sekrecije interferona tipa I (Saraiva i O'Garra 2010). Za regulaciju transkripcije *IL-10* od važnog značaja su i drugi faktori: protein Sp1 (engl. *specificity protein*, Sp), transkripcijski faktori STAT (engl. *transducers and activators of transcription*, STAT), regulatorni faktori interferona (engl. *interferon regulatory factors*, IRF), AP1 (engl. *activator protein*, AP), CREB (engl. *cAMP response element binding protein*, CREB), C/EBP (engl. *CCATT/enhancer binding protein*, C/EBP), faktor c-mišićnoaponeurotičnog fibrosarkoma (engl. *c-musculoaponeurotic fibrosarcoma factor*, c-MAF). Postoje različiti mehanizmi regulacije njegove ekspresije specifični za pojedine tipove stanica (Saraiva i O'Garra 2010; Iyer i Cheng 2012). Heterodimerni receptor IL-10 (IL-10R) eksprimiraju svi tipovi leukocita, a vezanjem

liganda pokreće se nizvodni signalni put JAK1/STAT3. Njime se aktiviraju ciljni geni koji imaju funkciju smanjenja ekspresije 15-20% proupalnih gena aktiviranih signaliziranjem TLR (Hutchins i sur. 2013). Djelovanjem na stanice urođene imunosti IL-10 indirektno regulira T-limfocitne odgovore. Inhibira efektorske funkcije makrofaga kroz inhibiciju ekspresije kostimulatornih molekula i glavnog kompleksa tkivne podudarnosti klase II (engl. *major histocompatibility complex II*, MHC II) sposobnosti fagocitoze i proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta i dušičnog monoksida). IL-10 smanjuje sintezu proupalnih citokina IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α i sekreciju kemokina u dendritičkim stanicama te inhibira njihovu migraciju u limfne čvorove. IL-10 porijeklom od T_H1 i T_H2 limfocita dodatno inhibira prezentaciju antigena i kostimulaciju makrofaga i dendritičkih stanica te se na taj način negativno regulira odgovor samih o T_H1 i T_H2 limfocita (Couper i sur. 2008; Cyktor i Turner 2011).

1.2.4. Transformirajući faktor rasta β

Transformirajući faktor rasta β (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- β) je citokin koji učestvuje u procesima stanične proliferacije, diferencijacije, adhezije, migracije, apoptoze i sinteze komponenti ekstracelularnog matriksa (engl. *extracellular matrix*, ECM) kroz koje održava homeostazu razvoja različitih tipova tkiva. Imunomodulatorni je citokin i neophodan je za diferencijaciju imunskih stanica, njihovih populacija i odgovora. Njegovo djelovanje je primarno usmjereno na T limfocite i adaptivni imunski odgovor. Kod kroničnih ozljeda jetre, TGF- β pokreće proces fibrogeneze (odgovor zarastanja rana) stimuliranjem aktivacije hepatičnih stelatnih stanica (engl. *hepatic stellate cells*, HSC) i njihove tranzicije u miofibroblaste koji secerniraju komponente ECM-a. Kod sisavaca prisutan je u tri izoforme: TGF- β 1 koja je najviše zastupljena, TGF- β 2 i TGF- β 3. Mogućnost sinteze i sekrecije TGF- β kao i odgovora na njega imaju gotovo svi tipovi stanica. Sintetizira se kao inaktivni peptid koji se sastoji od dugog N-terminalnog dijela, peptida povezanog sa latentnošću (engl. *latency-associated peptide*, LAP) i kratkog C-terminalnog dijela koji je aktivni TGF- β . Po dospijeću u ER, djelovanjem enzima furinaze ta dva dijela se cijepaju i svaki formira homodimer. TGF- β homodimer ostaje nekovalentno povezan s homodimerom LAP, u konformaciji u kojoj su mjesta vezanja za receptor TGF- β R zakrivljena LAP-om. Sekrecija TGF- β u obliku inaktivne molekule predstavlja mehanizam kontrole njegove aktivnosti. Aktivacija TGF- β je tkivno specifična. Članovi porodice integrina α v mogu se vezati za motiv od tri aminokiseline nazvan RGD koji se nalazi u domeni LAP TGF- β 1 i TGF- β 3 i aktivirati

ih ispoljavanjem deformirajuće mehaničke sile. Za aktivaciju TGF- β su neophodni integrini $\alpha\beta6$, kojeg eksprimiraju epitelne stanice i $\alpha\beta8$ kojeg eksprimira znatno više tipova stanica (endotelne stanice i astrociti u mozgu, mezangijalne stanice bubrega, epitelne stanice dišnih puteva, dendritičke stanice i CD4⁺ T limfociti), a miofibroblasti posjeduju $\alpha\beta3$ i $\alpha\beta5$. Pored integrina, *in vivo* je pokazano da trombospondin-1 također aktivira TGF- β , dok je mogućnost aktivacije matriks metaloproteinazama, plazminom i fibronektinom potvrđen samo u uvjetima *in vitro*. (Hayashi i Sakai 2012; Travis i Sheppard 2014). TGF- β se na ciljnoj stanici prvo veže za TGF- β RII homodimer nakon čega se regrutiraju dvije molekule TGF- β RI tvoreći tetramerni receptor koji zatim aktivira nizvodne signale puteve. U prvom redu to je put Smad, a pored njega TGF- β može aktivirati i nekoliko signalnih puteva neovisnih o Smad: MAPK, PI3, Wtn, što u konačnici rezultira inhibicijom ili aktivacijom ekspresije ciljnih gena. Njegovo djelovanje može biti autokrino i parakrino. Utvrđeno je da je TGF- β neophodan za razvoj i sazrijevanje CD4⁺ T limfocita, čijoj homeostazi doprinosi sprječavanjem njihove proliferacije i spontane diferencijacije. Miševi s nedostatkom TGF- β , po rođenju razvijaju višeorgansku upalu i ugibaju nakon 2-3 tjedna života. Razvoj CD4⁺ T u T_H1 i T_H2 podtipove može spriječiti inhibicijom ekspresije transkripcijskih faktora ključnih za njihovu diferencijaciju, T-bet kod T_H1 i GATA-3 kod T_H2 limfocita. TGF- β može pozitivno regulirati diferencijaciju i protektivnih perifernih T_{reg} (iT_{reg}) kao i T_H17 limfocita povezanih s autoimunim procesima. Da li će njegovo djelovanje biti pro- ili protuupalnog karaktera ovisi o kontekstu situacije. Odlučujuću ulogu vjerovatno ima trenutna koncentracija TGF- β i prisutnost drugih citokina: niske koncentracije potiču ekspresiju Foxp3 transkripcijskog faktora T_{reg} stanica, dok više koncentracije TGF- β zajedno s proupalnim IL-6 i IL-21 citokinima potiču ekspresiju transkripcijskog faktora ROR γ t T_H17 limfocita i time njihovu diferencijaciju. Pored toga, TGF- β spašava i populaciju timusnih T_{reg} limfocita (nT_{reg}) inhibirajući njihovu apoptozu tijekom razvoja u timusu. TGF- β također kontrolira proliferaciju CD8⁺T limfocita, i ima inhibitorno djelovanje na efektorske funkcije perifernih citotoksičnih limfocita (engl. *citotoxic T lymphocytes*, CTL). Važan je faktor za razvoj Langerhansovih stanica te dendritičkih stanica u koži, a funkcije dendritičkih stanica može različito regulirati (Worthington i sur. 2012).

1.3.Povezanost stresa ER-a, upale i patofiziologije bolesti jetre

Parenhim jetre čine hepatociti koji obavljaju najveći broj funkcija ovog vitalnog organa: proizvode i secerniraju žuč, proteine plazme (albumin, plazminogen, apolipoprotein,

transferin), vrše detoksifikaciju toksičnih tvari, glukoneogenezu, održavaju homeostazu lipida te neutraliziraju amonijak u ciklusu uree (Mescher 2013). Usklađivanje i kontrola ovih funkcija omogućena je komunikacijom između hepatocita i neparenhimalnih stanica kojima pripadaju rezidentni makrofagi ili Kupferove stanice, endotelne stanice sinusoidnih kapilara (engl. *sinusoidal endothelial cells*, SEC) i stelatne stanice jetre (engl. *hepatic stellate cells*, HSC). Njihova komunikacija može biti direktna (samo između hepatocita, posredstvom pukotinastih veza) ili indirektna (posredstvom citokina, kemokina, reaktivnih kisikovih vrsta koji mogu djelovati autokrino ili parakrino). SEC i Kupferove stanice djeluju kao profesionalne antigen-prezentirajuće stanice i uklanjaju različite supstance koje u jetru iz probavnog sustava dopijevaju portalnom venom. SEC dodatno učestvuju i u kontroli protoka krvi (Kmieć 2001). Kupferove stanice se nalaze u lumenu sinusoida, imaju sposobnost fagocitoze, oksidativnog napada, uklanjaju stare i oštećene eritrocite i razgrađuju hemoglobin. U Disseovom prostoru (perisinusoidalni prostor između jetrenih sinusoida i hepatocita) nalaze se mirujuće HSC koje u lipidnim kapljicama u citosolu pohranjuju retinoide, a sudjeluju i u kontroli protoka krvi kroz sinusoidne. Prilikom kroničnih ozljeda jetre koje izazivaju razni faktori poput toksičnih spojeva, mehaničke sile, infekcija, autoimunskih reakcija, metaboličkih bolesti, spojevi iz oštećenih hepatocita, upalni medijatori aktiviranih Kupferovih i infiltriranih upalnih stanica (citokini IL-1, IL-6, TNF- α , kemokini, faktori rasta, reaktivne kisikove vrste) te promjene građe ECM-a potiču aktivaciju HSC (Stalnikowitz i Weissbrod 2003). Aktivacijom se HSC transformiraju u miofibroblaste koji migriraju na mjesto upale gdje proizvode i secerniraju komponente ECM-a (kolagen tipa I i II, fibronektin) tj. posreduju u procesu su fibrogeneze (procesa zacjeljivanja). Usljed kronične aktivacije HSC, ožiljkasto tkivo nastaje u količini u kojoj narušava normalnu građu jetre i time njene funkcije) (Kmieć 2001). Kronične bolesti jetre popraćene su fibrozom kao i stresom ER-a.

Stres ER-a u hepatocitima mogu uzrokovati reaktivni radikali, akumulacija lipida i posljedično otpuštanje Ca^{2+} iz ER-a, upalni procesi kao i povećan nivo glukoze (Garg i sur. 2012). Prilikom aktivacije odgovora UPR, njegovi signalni putevi PERK i IRE-1 α mogu dovesti do aktivacije glavnih imunosnih transkripcijskih faktora NF- κ B i AP1 te time do sinteze i secerniranja proupalnih citokina. Hepatična upala kroz secerniranje IL-6 i IL-1 β može uzrokovati inzulinsku rezistenciju i na taj način doprinijeti razvoju pretilosti i dijabetesa tipa II. Upala prati i može pogoršati većinu hepatotoksičnih stanja: ozljede izazvane ishemijom i reperfuzijom, steatozu i nealkoholne bolesti masne jetre (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD), infekcije i intoksikacije ksenobiotičima. Utjecaj stresa ER-a je najviše proučen u razvoju poremećaja spektra NAFLD koje obuhvataju hepatičnu steatozu kao

najblaži oblik, nealkoholni steatohepatitis, te cirozu. NAFLD spektar je popraćen nakupljanjem masti u hepatocitima, a progresija bolesti upalom, ozljedom jetre i fibrozom. Nakupljanje masti u hepatocitima (steatoza) može biti uzrokovano poremećajem metabolizma lipida kao i prehranom sa prekomjernim udjelom masti što dovodi do stresa ER-a u hepatocitima. Međutim sam stres ER-a također može voditi ka razvoju steatoze moduliranjem upale i lipidnog metabolizma. Upalu uzrokuje sekrecija i djelovanje proupalnih citokina posredovana aktiviranim NF- κ B i AP1 transkripcijskim faktorima. Proupalni citokini uzrokuju pojačanu ekspresiju i aktivaciju CREBH-a. CREBH je transkripcijski faktor specifičan za jetru, modulator je odgovora akutne faze i metabolizma lipida i glukoze (Zhang i sur. 2006). Jedan od mogućih puteva nastanka steatoze je aktivacijom puta PERK, u kojem dolazi do aktivacije ATF4 čime se pojačava ekspresija enzima uključenih u lipogenezu (Ali i Zhang, 2018). ATF4 također aktivira CHOP transkripcijski faktor koji na različite načine utiče na stres ER-a. ATF4 i CHOP zajedno aktiviraju TRB3 (engl. *tribbles homolog 3*) koji inhibira posrednika inzulinskog signaliziranja u hepatocitima, Akt kinazu, također doprinoseći lipogenezi (Dara i sur. 2011). Akumulacija masnih kiselina je toksična za hepatocite, te usljed povećanja reaktivnih kisikovih radikala i stresa ER-a, dolazi do odumiranja stanica, pa je steatoza popraćena upalom, oštećenjima i fibrozom jetre. Težina bolesti je u korelaciji s povećanjem apoptoze hepatocita. Pojačanu ekspresiju proapoptotskih gena aktivira CHOP PERK puta. Apoptozu vjerojatno uzrokuje i mitohondrijska disfunkcija usljed narušene homeostaze Ca^{2+} -ER-a (Gentile i sur. 2011). Kako pretilost, steatoza i upala mogu uzrokovati stres ER-a, ova stanja međusobno pojačavaju jedna druge što pogoduje daljnjoj progresiji bolesti.

1.4. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR)

Kvantitativne lančana reakcija polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) je unaprijeđena metoda umnažanja ciljnih dijelova genetičkog materijala koja za razliku od obične PCR metode u toku samog umnažanja ujedno vrši detekciju nastalih produkata. Detekcija količine nastalog produkta je omogućena korištenjem spojeva koji se vežu za produkte i fluoresciraju, pa je količina fluorescentnog signala proporcionalna količini produkta. Uređaji qPCR bilježe jačinu fluorescentnog signala kroz cikluse reakcije, na osnovu čega se formira krivulja. Signal je na početku slab, zatim sa porastom količine produkta ulazi u fazu eksponencijalnog rasta, da bi pri kraju dosegnuo plato fazu usljed potrošenosti nekog od sastojaka reakcijske smjese. U eksponencijalnoj fazi rasta signala, programski ili ručno (po

provjeri signala pojedinačnih jažica u prvim ciklusima) odabire se bazična razina fluorescencije (engl. *basic line*) za koju se očitava redni broj ciklusa reakcije u kojem je signal uzorka dosegnuo spomenutu razinu. Ta vrijednost označava se kao Ct (engl. *cycle threshold*) i obrnuto je proporcionalna količini produkta reakcije. Ct vrijednosti se koriste za kvantifikaciju inicijalne količine genetičkog materijala ili razlika u količinama istog između više uzoraka (Kubista i sur. 2006).

Detekcija molekula produkta je moguća zahvaljujući uporabi različitih fluorescirajućih spojeva koji mogu biti nespecifični i specifični. U nespecifične spadaju boje koje interkaliraju u dvolančanu DNA usljed čega postaju fluorescentne, primjerice SYBER Green I. Budući da se boje vežu za sve dvolančane molekule, vezati će se i za neželjene produkte reakcije, poput dimera početnica, ukoliko su prisutne u uzorku. Iz tog razloga potrebno je analizirati uspješnost reakcije qPCR analizom krivulje taljenja kako bi se uvjerali u specifičnost PCR reakcija. U specifične spojeve se ubrajaju obilježene početnice i probe koje fluoresciraju samo po vezanju za ciljne segmente. Zato što mogu biti obilježene bojama koje emitiraju svjetlost različite valne duljine, probe se mogu koristiti za umnažanje i detekciju više produkata u jednom uzorku (multiplex PCR) (Bustin, 2005). Korištenjem različitih načina detekcije i instrumenata veće osjetljivosti značajno je povećana specifičnost i preciznost metode qPCR koja danas pored istraživačke, ima široku dijagnostičku primjenu: u detekciji i kvantifikaciji patogena, analizi SNP-ova (engl. *single nucleotide polymorphisms*) detekciji promjene genske ekspresije, detekciji kromosomskih aberacija.

Postoje dvije metode kvantifikacije kojima se može odrediti promjena ekspresije ciljnih gena: apsolutna i relativna kvantifikacija. Apsolutna kvantifikacija podrazumijeva stvaranje kalibracijske krivulje na osnovu serijskog razrjeđenja standarda čiji nam je broj kopija (količina) poznat. Kao standard se upotrebljavaju rekombinantna plazmidna DNA, genomska DNA, produkti RT-PCR-a (reverzna transkripcija PCR), komercijalno sintetizirani oligonukleotidi. Na osnovu linearne regresije kalibracijske krivulje, može se izračunati broj kopija ciljnog materijala koji se umnažao čime se formira njegova amplifikacijska krivulja. Relativnom kvantifikacijom se određuje promjena ekspresije ciljnog gena u odnosu na referentni gen. Izračun podrazumijeva poređenje ciklusa umnažanja ciljnog i referentnog gena. Kao referentni geni koriste se geni čija je ekspresija konstantna u tkivima. Postoji više metoda računanja relativne ekspresije gena gdje neke u formulu ne uključuju korekciju efikasnosti qPCR reakcije. Primjer takve je komparativna Ct metoda koja omogućuje usporedbu promjene ekspresije ciljnog gena između pojedinačnih uzoraka iz različitih

skupina. Danas prednost imaju računalni programi poput LightCycler Relative Quantification Software, Q-Gene, REST, kojima je ubrzan postupak izračuna promjene ekspresije gena.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada bio je analiza povezanosti pojave stresa endoplazmatskog retikuluma, upalne reakcije te patogeneze bolesti jetre. Kako je upalna reakcija odgovor imunskog sustava na oštećenja tkiva ili infekcije, u njeno moduliranje su uključeni citokini. Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze željela sam utvrditi relativnu ekspresiju gena citokina IL-1 β , IL-6, IL-10 i TGF- β kod miševa kojima je uzrokovan stres endoplazmatskog retikuluma i kroz usporedbu s kontrolnom skupinom, utvrditi način na koji se mijenja ekspresija spomenutih gena u uvjetima endoplazmatskog stresa u odnosu na normalne fiziološke uvjete.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom

Moj diplomski rad sastojao se od metodološkog i eksperimentalnog dijela. Metodološki dio obuhvaćao je uspostavu i optimiziranje kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) za gene od interesa *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB*. Za izvođenje qPCR koristila sam SYBR Green I boju koja je nespecifična jer interkalira u sve dobivene dvolančane produkte. Zbog toga je optimizacije metode tj. determinacija uvjeta reakcije qPCR pri kojima nastaje jedan specifični produkt neophodna. Optimizacija je podrazumijevala umnažanje četiri ciljna gena korištenjem najviše tri različita para početnica za svaki. Pored njih bilo je potrebno optimizirati qPCR metodu za odabrane referentne gene na osnovu kojih sam u eksperimentalnom dijelu određivala relativnu kvantifikaciju ciljnih imunskih gena. Kao referentne gene koristila sam $\beta 2$ mikroglobulin (engl. *beta 2 microglobulin*, *B2M*) i β aktin (engl. *beta-actin*, *ACTB*). Početnice su bile dizajnirane pomoću programa Primer Quest Tool (PQT) (<https://www.idtdna.com/pages>) ili su uzete početnice korištene u znanstvenim radovima navedenim u tablici 1.

Svaki par početnica za pojedine gene sam kombinirala s tri različite koncentracije $MgCl_2$ u reakcijskoj smjesi: 2.5 mM, 3 mM i 3.5 mM. Također sam umnažanje ciljnih gena isprobala na različitim temperaturama vezanja početnica koje su bile u rasponu od 54°C do 66°C.

Po završetku reakcije qPCR provjerila sam uspješnost i specifičnost reakcije za isprobane uvjete. Prvi korak bila je analiza krivulje taljenja produkata (engl. *melting curve*). Uzorci čije su krivulje imale jedan vršak, vjerojatno su sadržavali jedan produkt umnažanja. Također je moguć nastanak više produkata s istom temperaturom taljenja pa sam iz tog razloga dodatno provjeravala produkte PCR na poliakrilamidnom gelu.

Tablica 1. Početnice korištene za optimizaciju umnažanja ciljnih gena

Gen	Ime početnice	Sekvenca (5'→3')	Tm (°C)	Veličina produkta (pb)	Izvor
IL1B	IL1B For1	GGTACATCAGCACCTCACAA	62	124	PQT
	IL-1β Rev1	TTAGAAACAGTCCAGCCCATAC			
	IL-1β For2	ATGGGCAACCACTTACCTATTT	62	94	PQT
	IL-1β Rev2	GTTCTAGAGAGTGCTGCCTAAT			
IL-6	IL-6 For1	GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG	62	105	PQT
	IL-6 Rev1	TTGCCGAGTAGATCTCAAAGTG			
	IL-6 For2	CCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA	62	132	PQT
	IL-6 Rev2	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC			
IL-10	IL-10 For1	CCCTTTGCTATGGTGTCTTTTC	62	107	PQT
	IL-10 Rev1	AGGATCTCCCTGGTTTCTCTTC			
	IL-10 For2	CCAAGACCAAGGTGTCTACAA	62	126	PQT
	IL-10 Rev2	GGAGTCCAGCAGACTCAATAC			
TGF-β	TGF-β For1	AGAGCCCTGGATACCAACTA	62	92	PQT
	TGF-β Rev1	CAACCCAGGTCCTTCCTAAAG			
	TGF-β For2	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG	62	101	PQT
	TGF-β Rev2	GTGTGTCCAGGCTCCAAATA			
B2M	B2M For1	CCTGCAGAGTTAAGCATGACAGT	59	78	*1
	B2M Rev1	TCATGATGCTTGATCACATGTCT			
	B2M For2	CTGACCGGCCTGTATGCTAT	58	146	*2
	B2M Rev2	CCGTTCTTCAGCATTTGGAT			
ACTB	ACTB For1	GCAAGCAGGAGTACGATGAG	58	147	*3
	ACTB Rev1	CCATGCCAATGTTGTCTCTT			
	ACTB For2	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAA A	63	349	*4
	ACTB Rev2	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC C			
*1 Ren i sur. 2010					
*2 Hein i sur. 2001					
*3 Liu i sur. 2010					
*4 Razzaghian 2008					

3.1.1. Poliakrilamidna gel elektroforeza

Procjenu specifičnosti qPCR reakcije sam finalizirala izvođenjem poliakrilamidne gel elektroforeze (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE). Za izradu dva 12%-tna poliakrilamidna gela (PAA) koristila sam sastojke u volumenima prikazanim u tablici 2. Te

pufer 1X TBE (1 L pufera 1X TBE dobijemo dodavanjem 100 mL 10X TBE u 900 mL destilovane vode). Uzorcima odabranih uvjeta reakcije qPCR u jažicama na qPCR ploči sam direktno dodavala 7 μ L boje (bromfenol plavo), a zatim dodavala u jažice PAA gela 25 μ L uzorka sa bojom. Također sam u jednu jažicu po gelu dodavala 5 μ L markera. Elektroforezu sam izvodila pri 100 V, 400 mA u trajanju od 180 minuta. Po završetku, gelove sam tretirala etidij bromidom (boja koja interkalira u dvolančanu DNA) kako bi produkti bili vidljivi pod UV svjetlom u obliku vrpce. Zatim sam gelove stavljala u UV transiluminator, slikala i bilježila rezultate.

Tablica 2. Sastojci i njihovi volumeni za 12% PAA gel

Sastojci smjese	Volumen sastojaka za dva gela
H ₂ O	17,55 mL
10X TBE*	9,75 mL
40% Akrilamid	11,7 mL
10% APS	390 μ L
TEMED	39 μ L
* 10X TBE pufer: 890 mM Tris, 890 mM borna kiselina, 20 mM EDTA; pH 8.3	

3.1.2. Analiza efikasnosti amplifikacije

Za reakcijske uvjete kod kojih je dobiven jedan specifični produkt odgovarajuće veličine utvrđena je efikasnost reakcija umnažanja. Teoretski bi se količina DNA, a time i intenzitet mjerenog fluorescentnog signala u svakom sljedećem ciklusu PCR reakcije trebala udvostručiti. Za takvu reakciju efikasnost je 100%. U realnim uvjetima na efikasnost reakcije djeluje mnogo faktora, nemoguće je savršeno umnažanje ciljane DNA pa se za efikasne reakcije uzimaju vrijednosti u rasponu od 95 do 110%. Kako bih u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada mogla usporediti ekspresije ciljnih gena dvije grupe (kontrolne i eksperimentalne) u odnosu na referentne gene, bilo je potrebno dobiti efikasnost reakcija u tom rasponu. U svrhu ove analize, od svakog uzorka s jednim specifičnim produktom sam uzimala 1 μ L cDNA kao početnu količinu, te pravila još 10 x i 100 x razrjeđenja. Uzorke u ove tri koncentracije sam u jažice ploče pipetirala u triplikatima. Jedna reakcijska smjesa sadržavala je 23 μ L skupne otopine, 1 μ L parova početnica i 1 μ L cDNA. Za računanje efikasnosti računalni program koristi Ct vrijednosti razrjeđenja uzoraka i njihove početne

koncentracije. Rezultat funkcije Ct vrijednosti i logaritma početnih koncentracija uzoraka jeste pravac na osnovu čijeg nagiba se računa efikasnost reakcije po jednađbi:

$$E = 10^{-1(\text{nagib prave})}; \%E = E - 1(\times 100).$$

3.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena citokina IL-1 β , IL-6, IL-10 i TGF- β

3.2.1. Uzorci tkiva

Za izvođenje eksperimentalnog dijela diplomskog rada koristila sam uzorke tkiva jetre 10 miševa soja C57BL6NCrl (mužjaci starosti devet mjeseci) koji su uzgojeni u okviru aktivnosti HRZZ projekta IP-2016-06. Životinje su držane u standardnim uvjetima a eksperimenatni rad odobren je od strane nadležnog bioetičkog povjerenstva. Od ukupno 10 životinja, pet jedinki je intraperitonealno injicirano 3 μ g tunikamicina (Cell Signalling Technology) po g tjelesne težine i iste su žrtvovane 12 sati nakon tretmana spoja. Tunikamicin je antibiotik koji sprječava prenos N-glukozamina na izoprenoidni lipidni dolikol fosfat, inhibirajući početni korak sinteze prekursora N-glikoproteina. Posljedično izostaje korak glikozilacije novonastalih proteina u lumenu ER-a, dolazi do njihovog nakupljanja i stresa organele (Foufelle i Fromenty, 2016). Po uzorkovanju, tkivo smo smrznuli u tekućem dušiku i pohranili na -80°C.

3.2.2. Izolacija RNA

Za homogenizaciju i izolaciju RNA koristila sam komercijalno dostupan komplet kemikalija RNeasy Mini Kit (QIAGEN) (Tablica 3) koristeći protokol proizvođača za purifikaciju totalne RNA iz animalnih tkiva.

Tablica 3. Komponente RNeasy Mini komplet za izolaciju RNA

Komponente kompleta		
Broj pripremanja	50	250
RNeasy Mini Spin kolone	50	250
Epruvete za prikupljanje (1.5 mL)	50	250
Epruvete za prikupljanje (2 mL)	50	250
Pufer RLT	45 mL	220 mL
Pufer RW1	45 mL	220 mL
Pufer RPE (koncentrirana otopina)	11 mL	65 mL
Voda bez RNaza	10 mL	50 mL

Tkivo jetre miševa je homogenizirano pomoću keramičkog tarionika i tučka uz zaljevanje tekućim dušikom kako bi niska temperatura spriječila aktivaciju enzima RNaza i time degradaciju RNA. Kada je pojedini uzorak tkiva poprimio konzistenciju praha, dodavala sam otopinu pufera RLT (koji je dio RNeasy Mini kompleta) i β -merkaptetoanola (Sigma Aldrich) (u 100 mL pufera RLT dodaje se 1 μ L β -merkaptetoanola). β -merkaptetoanol je kemikalija koja ireverzibilno denaturira RNaze reduciranjem disulfidnih veza. Uzorku tkiva od 20-30 g dodaje se 600 mL pufera RLT. Iako sam imala 10 uzoraka tkiva, skupnu otopinu (engl. *master mix*) sam radila za 11 uzoraka, uzevši u obzir mogućnosti pogreške prilikom pipetiranja i gubitka otopine: $(11 * 600 \text{ mL pufer RLT}) + (11 * 6 \mu\text{L } \beta\text{-merkaptetoanol})$. Uzorke sam zatim centrifugirala 3 minute pri najvećoj brzini, te odpipetirala supernatant u novu epruvetu od 1,5 mL. Njemu sam dodala jedan volumen etanola (70%), dobivši otopinu od oko 1200 μ L koju sam izmiješala pipetiranjem. 600 μ L uzorka (zajedno sa talogom ukoliko je bio prisutan) sam u dva puta prebacila u kolone RNeasy Mini Spin unutar epruvete za prikupljanje od 2 mL iz kompleta (jer je kapacitet kolone 600 μ L). Centrifugirala sam uzorke 15 sekundi pri 10 000 rpm (rotacija po minuti). Uzorcima sam u kolone RNeasy Mini Spin dodala 350 μ L pufera RW1, centrifugirala ih 15 sekundi pri 10 000 rpm nakon čega sam dekantirala sadržaj koji je prošao kroz kolone. Zatim sam uradila digestiju uzoraka DNazama. Inkubacijska otopina DNaza I priprema se dodavanjem 10 μ L koncentrirane otopine DNaza I u 70 μ L pufera RDD. Za ovaj korak sam također radila skupnu otopinu za 11 uzoraka: $(11 * 70 \mu\text{L pufer RDD}) + (11 * 10 \mu\text{L koncentrirane otopine DNaza I})$ koju sam lagano promiješala okretanjem epruvete i kratko centrifugirala kako bi se otopina DNaza spustila sa zidova epruvete. 80 μ L inkubacijske smjese sam zatim dodala svakom uzorku u kolonu RNeasy Mini Spin nakon čega su se inkubirali 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sam dodala 350 μ L pufera RW1 uzorcima u kolone RNeasy Mini Spin i

centrifugirala ih 15 sekundi pri 10 000 rpm te dekantirala sadržaj koji je prošao kroz kolone. U naredna dva koraka uzorcima se dodaje 500 μ L pufera RPE. Pufer RPE je u kompletu prisutan kao koncentrat (11 mL) i razrjeđuje se dodavanjem 4 volumena etanola (96%). Dodala sam 500 μ L razblaženog pufera RPE uzorcima u kolone RNeasy Mini Spin, centrifugirala ih 15 sekundi pri 10 000 rpm te dekantirala sadržaj koji je prošao kroz kolone. Zatim sam ponovno dodala 500 μ L pufera RPE te centrifugirala uzorke 2 minute pri 10 000 rpm. Tada sam premjestila kolonu RNeasy Mini Spin u novu epruvetu za prikupljanje od 2 mL te centrifugirala uzorke 1 minutu pri najvećoj brzini. Kolonu sam ponovno premjestila u novu epruvetu za prikupljanje od 1,5 mL. Zatim sam u kolonu dodala 30 μ L vode bez RNaza i centrifugirala uzorke 1,5 minuta pri 10 000 rpm kako bi se eluirala RNA.

Koncentraciju i čistoću dobivene RNA mjerila sam na valnoj duljini 260 nm, pomoću spektrofotometra Implen Nanophotometer, NP80 Mobile UV/VIS (200 nm – 950 nm), nakon čega sam uzorke pohranila na -80°C do daljnje obrade.

3.2.3.Reverzna transkripcija

Metodom reverzne transkripcije sam prevodila dobivenu RNA u cDNA koristeći se komercijalno dostupnim kompletom kemikalija „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) i protokolom proizvođača. Za reverznu transkripciju sam uzimala 1,5 μ g RNA. Skupnu otopinu radila sam za 11 reakcija od 10 uzoraka, uzevši u obzir mogućnost pogreške i gubitka skupne otopine prilikom pipetiranja (Tablica 4). Za svaku reakciju pipetirala sam 10 μ L skupne otopine i 10 μ L RNA.

Tablica 4. Sastav skupne otopine za reverznu transkripciju

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Volumen skupne otopine za 11 uzoraka (μL)
10X pufer RT	2	22
25X smjesa dNTP (100 mM)	0,8	8.8
10X nasumičnih početnica RT	2	22
Reverzna transkriptaza MultiScribe	1	11
Inhibitor RNaza	1	11
Voda bez nukleaza	3,2	35,2
Ukupni volumen reakcije	10	110

Reverznu transkripciju sam sproveda u uređaju Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) prema sljedećem programu: 10 minuta na 25°, 120 minuta na 37°, 5 minuta na 85°, te 4°C po završetku reakcije.

3.2.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR)

U završnoj fazi eksperimentalnog dijela umnažala sam cDNA kontrolnih životinja i životinja tretiranih tunikamicinom. Ciljne gene *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB* te referentne gene *B2M* i *ACTB* sam umnažala korištenjem odgovarajućih početnica i uvjeta qPCR reakcije koji su optimizacijskom dijelu dali jedan specifičan produkt. Jedna reakcijska smjesu sadržavala je 23 µL već pripremljene skupne otopine, 1 µL parova početnica i 1 µL cDNA. Skupne otopine s različitim koncentracijama MgCl₂ su prethodno pripremljene i njihov sastav je prikazan u tablici 5. Također sam stavila negativnu kontrolu, čiju reakcijsku smjesu je činilo 23 µL skupne otopine, 1 µL početnica i 1 µL H₂O. Uzorke sam u jažice qPCR ploče pipetirala u triplikatima, a negativnu kontrolu u duplikatima. qPCR reakciju sam izvela prema programu:

- 3 min na 95°C,
- 1 min na 95°C,
- 30 s na temperaturi vezanja početnica,
- 30 s na 72°C,
- 10 min na 72°C,
- ∞ na 4°C.

Tablica 5. Sastav skupne otopine za qPCR

	Sastojci skupne otopine							
	H2O	dNTPovi (svaki 5 mM)	M-Pufer (800 mM K)*	MgCl2 (25 mM)	Taq ₂	Syber green (dil. 1000 x)	ROX (dil. 100 x)	Ukupno skupne otopine (μL)
Vol. za 1 probu (μL)	15,75	1	2,5	2,5 (za 2,5 mM)	1	0,0025	0,25	23
	15,25			3 (za 3 mM)				
	14,75			3,5 (za 3,5 mM)				
Vol. za 500 proba (μL)	7875	500	1250	1250	500	1,25	125	11501,25
				1500				
	7625			1750				
*M-pufer: 800 mM KCl, 100 mM Tris-HCl; pH = 8.3								

3.2.5. Računalna obrada podataka

Rezultate dobivene qPCR-om ciljnih gena kontrolnih i tretiranih životinja analizirala sam u računalnom programu REST (engl. *relative expression software tool*). Program je osmišljen za relativnu kvantifikaciju između grupa sa većim brojem uzoraka te za određivanje statističkog značaja dobivenih rezultata. Matematički model je baziran na srednjoj devijaciji Ct vrijednosti između eksperimentalne i kontrolne grupe te efikasnosti PCR reakcije. U REST programu se također određuje i statističku značajnost dobivenih omjera ekspresije, za što koristi randomizacijski test (Pfaffl i sur. 2002). Relativni omjer genske ekspresije računa se po jednadžbi:

$$R = \frac{(E_{ciljni\ gen})^{\Delta Ct\ ciljni\ gen\ (A\ tretman - A\ kontrola)}}{(E_{ref.\ gen})^{\Delta Ct\ ref.\ gen\ (A\ tretman - A\ kontrola)}}$$

Vrijednosti relativne ekspresije ciljnih gena sam vizualno prikazala grafovima rađenim u programu GraphPad Prism 8.

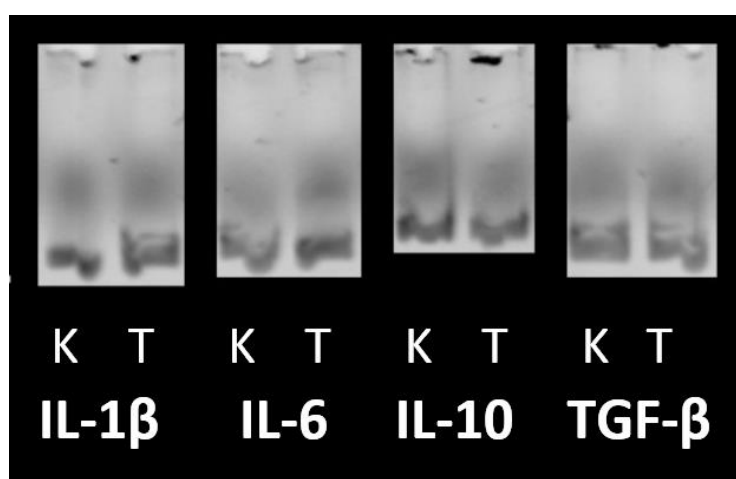
4. REZULTATI

Optimizacija qPCR metode, u kojoj se za detekciju produkta umnažanja upotrebljavaju nespecifični spojevi, neophodan je postupak kojim se osigurava specifičnost i efikasnost parova početnica za umnažanje ciljnih gena. Da bismo optimizirali umnažanje cDNA gena *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB*, različite parove početnica smo isprobavali u različitim uvjetima reakcije qPCR, pri različitim temperaturama vezanja početnica i različitim koncentracijama $MgCl_2$ u reakcijskoj smjesi. Uvjete reakcije pri kojim smo dobili jedan specifičan produkt koristili smo zatim u finalnoj reakciji qPCR na osnovu čijih rezultata smo odredili relativnu ekspresiju gena *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB* kod netretiranih i tretiranih miševa.

4.1. Optimizacija metode kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR)

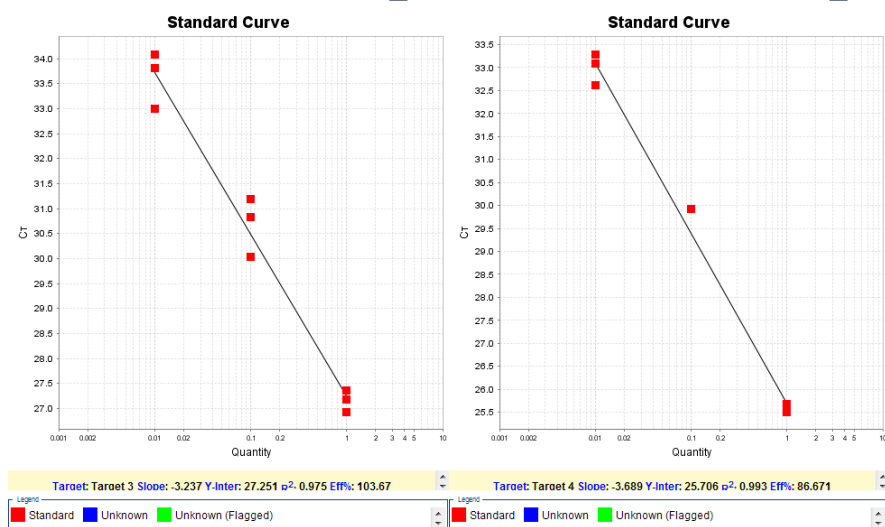
Parovi početnica za ciljne gene i uvjeti reakcija koji su pokazali postojanje jednog specifičnog produkta (Slika 2) odabrani su na osnovu T_m krivulja i PAGE elektorforeze. Optimalne uvjete umnažanja tj. efikasnost reakcija utvrdili smo pri sljedećim uvjetima:

- *IL1B* For2/Rev2 64°C, 3 mM $MgCl_2$;
- *IL6* For1/Rev1 63°C, 2.5 mM $MgCl_2$;
- *IL10* For2/Rev2 64°C, 3 mM $MgCl_2$;
- *TGFB* For2/Rev2 66°C, 3 mM $MgCl_2$.

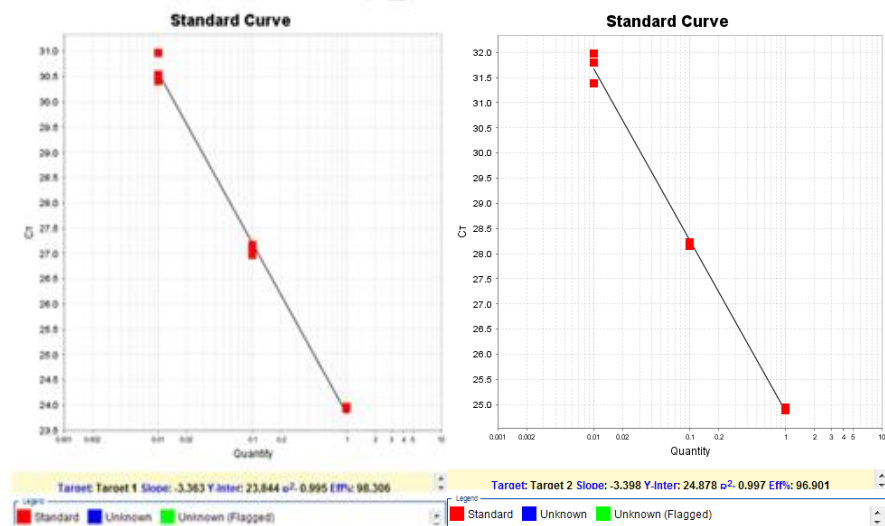


Slika 2. Elektroforetska provjera specifičnosti reakcije qPCR odabranih parova početnica (K-kontrola, T-tunikamicin)

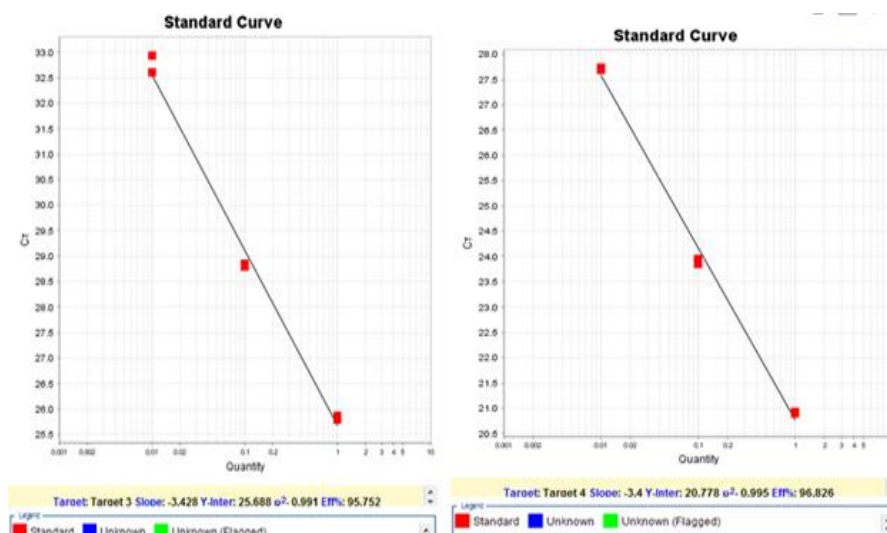
Krivulje analize efikasnosti odabranih početnica za ciljne gene prikazane su na Slici 3, 4, 5 i 6.



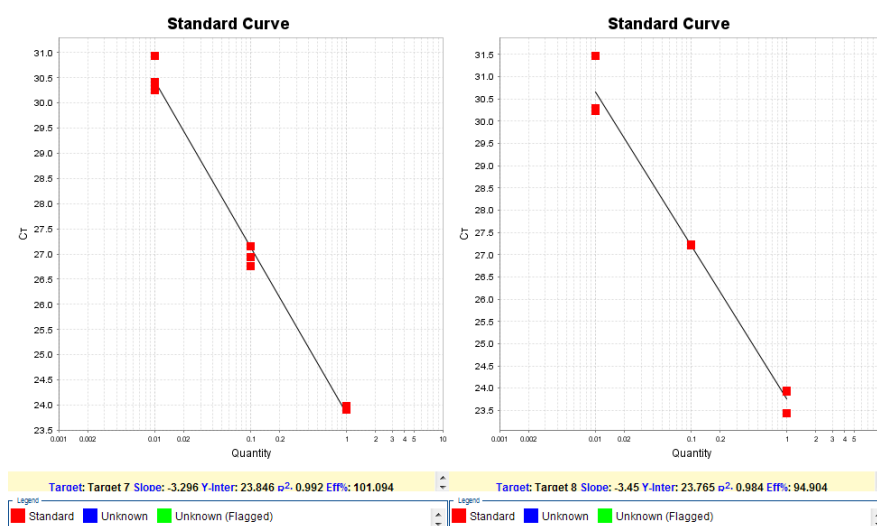
Slika 3. Efikasnost reakcije qPCR – početnice For2/Rev2 za *IL1B*
 Uvjeti reakcije: 64°C, 3 mM MgCl₂; kontrola (lijevo) i tunikamcin (desno)



Slika 4. Efikasnost reakcije qPCR - početnice For1/Rev1 za *IL6*
 Uvjeti reakcije: 63°C, 2.5 mM MgCl₂; kontrola (lijevo) i tunikamicin (desno)



Slika 5. Efikasnost reakcije qPCR – početnice For2/Rev2 za *IL10*
 Uvjeti reakcije: 64°C, 3 mM MgCl₂; kontrola (lijevo) i tunikamicin (desno)



Slika 6. Efikasnost reakcije qPCR – početnice za For2/Rev2 *TGFβ*
 Uvjeti reakcije: 66°C, 3 mM MgCl₂; kontrola (lijevo) i tunikamicin (desno)

4.2. Relativna kvantifikacija ekspresije gena citokina L-1 β , IL-6, IL-10 i TGF- β

Uspoređena je ekspresija gena u uzorcima jetre miševa soja C57Bl6N nakon 12 sati od apliciranja tunikamicina s uzorcima iz netretiranih miševa. Analiza je napravljena metodom qPCR. Rezultati su prikazani u Tablici 6. Stres ER-a uzrokovao je statistički značajno povećanje ekspresije proupalnih gena citokina IL-1 β (5 puta) i IL-6 (49 puta), a značajno smanjio ekspresiju gena protuupalnog IL-10 (0.5 puta). Ekspresija gena TGF- β je također bila u porastu, međutim rezultat njene promjene nije bio statistički značajan (Slika 7).

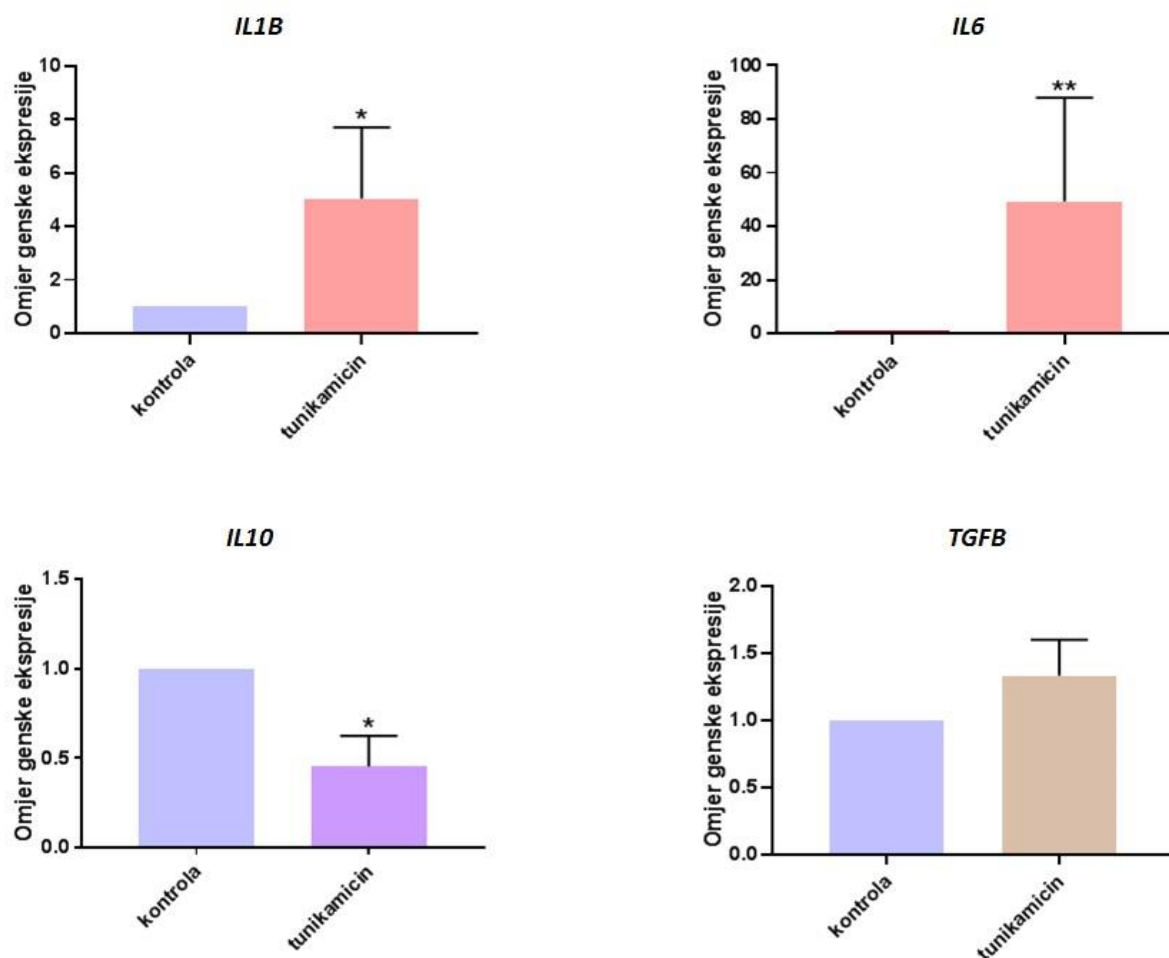
Tablica 6. Promjena genske ekspresije *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB*

	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL10</i>	<i>TGFB</i>
Relativni omjer genske ekspresije	5,056	49,317	-2,201	1,332
Apsolutna genska regulacija	5,056	49,317	0,454	1,332
Standardna greška apsolutne genske regulacije	±2,66292	±38,65373	±0,1701	±0,26634

Rezultati su prikazani kao relativni omjer genske ekspresije (promjena izračunata prema formuli)

$$R = \frac{(E_{ciljni\ gen})^{\Delta Ct\ ciljni\ gen\ (A\ tretman - A\ kontrola)}}{(E_{ref.gen})^{\Delta Ct\ ref.gen\ (A\ tretman - A\ kontrola)}}$$

u odnosu na referentne gene β aktin (*ACTB*) i $\beta 2$ mikroglobulin (*B2M*).



Slika 7. Usporedba relativne ekspresije *IL1B*, *IL6*, *IL10* i *TGFB* između kontrolne i eksperimentalne skupine miševa. Miševi su tretirani tunikamicinom, izolirana je RNA iz jetre te metodom qPCR analizirana ekspresija u kontrolnim i eksperimentalnim uzorcima. Vrijednosti ekspresije ciljnih gena normalizirane su u odnosu na referentne gene, β -aktin i $\beta 2$ mikroglobulin; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem željeli smo koristeći soj miševa C57BL6N utvrditi poveznice između stresa ER-a, upale koju uzrokuje i razvoja patoloških promjena i bolesti jetre. Danas se ovi procesi intenzivno istražuju da bi se protumačio nastanak i progresija bolesti spektra NAFLD. Lee i sur. (2012) su potvrdili da stres ER-a uzrokovan primjenom tunikamicina može uzrokovati steatozu i upalu jetre miševa tj. brzi oblik bolesti NASH kod miševa. Stres ER-a uzrokovao je pojačanu ekspresiju transaktivatora i enzima *de novo* lipogeneze te smanjenje enzima oksidacije masnih kiselina i lipolize. Histološkom analizom su utvrdili da se pri stresu ER-a u hepatocitima stvaraju masne kapljice, dok su u *in vitro* uvjetima dokazali direktno pojačavanje *de novo* lipogeneze. Na osnovu tih rezultata potvrdili su da stres ER-a može inicirati patološke promjene ili pojačati progresiju bolesti.

U našem istraživanju koristeći tretman tunikamicinom utvrdili smo utjecaj akutnog stresa ER-a na ekspresiju pojedinih citokina. Tretman tunikamicinom statistički značajno je povećao ekspresiju mRNA *IL1B* čijom translacijom nastaje neaktivna forma citokina. Kako bi se dokazala povećana sinteza i secerniranje aktivnog IL-1 β koji je medijator upalnih procesa u tkivu, u istraživanje je potrebno uključiti i mjerenje njegove koncentracije u tkivu ili serumu. Povećanu ekspresiju mRNA *IL1B*, aktivaciju inflammasoma i secerniranje aktivnog IL-1 β usljed stresa ER-a izazvanog primjenom tunikamicina u *in vitro* i *in vivo* uvjetima zabilježili su Kim i sur. (2013), Kim i sur. (2015), Zhang i sur. (2016). Ren i sur. (2012) i Lebeaupin i sur. (2015) su u *in vitro* uvjetima ustanovili sinergističko djelovanje lipopolisaharida i stresa ER-a budući da su pri njihovom kotretmanu zabilježene najveće vrijednosti ekspresije *IL1B*, *CHOP*, kaspaze 1 i 2 te najmanja vijabilnost stanica. Dodatno, tretman tunikamicina je kod miševa *ob/ob*, koji su skloni debljanju zbog mutacije gena za hormon leptin, uzrokovao stres ER-a, povećanu aktivaciju kaspaze 1 i 11 i koncentraciju IL-1 β u serumu te apoptozu stanica (Lebeaupin i sur. 2015). Za nastanak aktivne forme IL-1 β potrebna je aktivacija inflammasoma. Među njima je najviše izučen inflamansom NLRP3 za čiju aktivaciju je potreban ROS. Wree i sur. (2012) su pokazali da kontinuirana aktivnost inflammasoma NLRP3 pored upale uzrokuje piroptozu i fibrozu jetre. Piroptoza je oblik programirane smrti za koju je karakteristična aktivacija kaspaze 1, oštećenje DNA, bubrenje stanice i otpuštanje proupalnih medijatora. Rezultati istraživanja molekularnih mehanizama aktivacije inflammasoma u uvjetima stresa ER-a su neujednačeni. U nekoliko istraživanja protein u interakciji s tioredoksinom, (engl. *thioredoxin-interacting protein*, TXNIP) je determiniran kao glavna komponenta koja

povezuje stres ER-a i aktivaciju inflammasoma, iako se međusobno mehanizmi regulacije ekspresije i aktivacije TXNIP-a razlikuju (Lerner i sur. 2012, Osowski i sur. 2012, Kim i sur. 2013). Lebeaupin i sur. (2015) nisu zabilježili povećanu ekspresiju *TXNIP* u uvjetima stresa ER-a te su ukazali na moguće postojanje drugačijeg mehanizma aktivacije. Menu i sur. (2012) za razliku od spomenutih nisu našli poveznicu između grana UPR-a i aktivacije NLRP3 inflammasoma te su također pretpostavili postojanje mehanizma neovisnog o UPR-u. Moguće je da se pri stresu ER-a aktiviraju istovremeno i drugi tipovi inflammasoma čemu je potrebno posvetiti pažnju u predstojećim istraživanjima.

Uočena značajno povećana ekspresija *IL6* usljed primjene tunikamicina u suglasnosti je s rezultatom istraživanja Lee i sur. (2012) u kojem je dodatno utvrđena i povećana koncentracija serumskog IL-6 te mišjih proteina odgovora akutne faze. Povećane vrijednosti IL-6 u serumu zabilježene su i kod miševa *ob/ob* tretiranih tunikamicinom (Lebeaupin i sur. 2015), a Rao i sur. (2014) su dokazali da se stres ER-a javlja pri ishemiji i reperfuziji jetre miša i uzrokuje povećanu sintezu IL-6 kod Kupferovih stanica izoliranih iz ishemične jetre. Ren i sur. (2014) nisu pronašli povećanu ekspresiju *IL6* kada su u uvjetima *in vitro* primjenjivali tunikamicin. Međutim, uključivanje LPS-a u tretman je izazvalo značajno povećanje ekspresije *IL6*.

Utjecaj farmakološki izazvanog stresa ER-a na ekspresiju *IL10* je slabije istražen u odnosu na ekspresiju proupalnih citokina. U nedostatku istraživanja u kojima su korišteni slični uvjeti izazivanja stresa ER-a kod miševa, usporedili smo rezultate s drugačijim modelima u kojima je praćena promjena ekspresije proupalnih *IL1* i *IL6* i protuupalnog *IL10*. U istraživanju Rao i sur. (2014) su dokazali da se stres ER-a javlja prilikom ishemije i reperfuzije jetre miša. Kod Kupferovih stanica izoliranih iz ishemične jetre zabilježena je povećana sinteza IL-6 i IL-10. Međutim dodatni tretman LPS-om je povećao sintezu proupalnog citokina IL-6, dok se sinteza IL-10 smanjila. Takav profil ekspresije zabilježen je i u kulturi makrofaga iz koštane srži kod kojih je stres ER-a uzrokovan farmakološkim putem, primjenom kotretmana tunikamicina i LPS-a. Chen i sur. (2012) i Ren i sur. (2014) su determinirali stres ER-a kao faktor progresije patoloških procesa u modelu akutnog zatajenja jetre miševa. I u ovom modelu potvrđeno je sinergističko djelovanje stresa ER-a i TLR signaliziranja kroz povećanu sintezu proupalnih citokina, IL-1 β i IL-6, pri čemu su Chen i sur. (2012) dodatno zabilježili smanjenu sintezu protuupalnog IL-10.

U našem istraživanju utvrdili smo povećanu ekspresiju TGF- β koja nije dosegla statističku značajnost (Slika 7). Koo i sur. (2016) su ispitivali utjecaj stresa ER-a u glavnim efektorima fibrogeneze jetre, stelatne stanice jetre, na proces razvoja fibroze u *in vivo* (na

miševima) i *in vitro* uvjetima. Ustanovili su da stres ER-a uzrokuje pojačanu aktivaciju HSC, secerniranje TGF- β i time inicijaciju fibrogeneze. U istraživanju Tamaki i sur. (2008) u animalnom modelu u kojem je usljed kolestaze došlo do stresa ER-a hepatocita, ustanovljena je povećana ekspresija *TGFB*, povećana apoptoza hepatocita i posljedično aktivacija HSC-a i razvoj fibroze. Razlog izostanka statistički značajne povećane ekspresije *TGFB* u uvjetima stresa ER-a u našem istraživanju je možda kratak vremenski interval između tretmana tunikamicinom i mjerenja ekspresije citokina. Koo i sur. (2016) su ekspresiju *TGFB* mjerili nakon jednog, dva i tri dana od tretmana, a do statistički značajnog povećanja njegove ekspresije došlo je nakon drugog dana, dok su Tamaki i sur. (2008) mjerenje vršili nakon 14 dana. 12 sati od primjene tretmana možda nije dovoljno vrijeme da se pri stresu ER-a HSC aktiviraju i potaknu na povećanu transkripciju i sintezu TGF- β . U nutritivnom modelu NASH ustanovljeno je da signaliziranje TGF- β doprinosi razvoju steatoze, apoptoze i ozljede tkiva, upale i fibroze (Yang i sur. 2014).

Dosadašnja istraživanja molekularnih puteva stresa ER-a ukazuju na mogućnosti sve tri grane UPR-a da različitim mehanizmima aktiviraju glavni transkripcijski faktor upalnih procesa, NF- κ B. U citosolu je NF- κ B prisutan u neaktivnoj formi, vezan za inhibitor κ B (engl. *inhibitor kappa B*, I κ B). I κ B ima kraći polужivot od NF- κ B pa uslijed inhibicije translacije proteina uzrokovanom aktivacijom puta PERK može doći do povećanog omjera NF- κ B u odnosu na I κ B i povećane količine slobodnog NF- κ B koji migrira u jezgru i aktivira gene proupalnih odgovora. Aktivirana IRE-1 α može stupiti u interakciju s faktorom povezanim s receptorom za TNF α (engl. *TNF- α receptor associated factor 2*, TRAF2). Ovaj kompleks može aktivirati I κ B kinazu (engl. *inhibitor kappa B kinase*, IKK) koja fosforilacijom I κ B dovodi do oslobađanja i aktivacije NF- κ B (Kitamura 2009). IRE1- α -TRAF2 kompleks može pojačati ekspresiju proupalnih gena i putem aktivacije AP1, preko pokretanja signalnog puta ASK1-JNK. ATF6 aktivaciju NF- κ B može uzrokovati preko aktivacije Akt kinaze (protein B kinaze) (Kitamura 2009). Kim i sur. (2013) su ustanovili da stres ER-a smanjuje razinu I κ B. Aktivaciju NF- κ B izazvanu povećanom fosforilacijom I κ B uočili su Lee i sur. (2012), dok tretman tunikamicinom nije značajno utjecao na aktivaciju puta c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK). Nasuprot tome, u istraživanju Zhang i sur. (2016) JNK put je bio aktiviran u uvjetima stresa ER-a za što je odgovorna bila IRE-1 α grana UPR-a. ATF6 put nije bio aktiviran kao niti u istraživanju Lebeaupin i sur. (2015) u kojem je kao glavna osa stresa ER-a koja uzrokuje upalu i ozljedu tkiva jetre uslijed povećane smrti hepatocita predložena PERK-IRE1- α -CHOP osa. Chen i sur. (2012) i Ren i sur. (2014) su kao centralnog regulatora ekspresije citokina determinirali kinazu glikogen sintaze-3 β (engl.

glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β) i pokazali da stres ER-a uzrokuje njenu pojačanu enzimatsku aktivnost (defosforilacijom serina 9), te da posljedično njena aktivacija uzrokuje aktivaciju MAPK i NF- κ B puteva i ekspresiju proupalnih citokina. Njihov nalaz je u suglasnosti s inicijalnim istraživanjem Martin i sur. (2005) koje je pokazalo da se pri tretmanu LPS-om aktivira PI3K-Akt put kojim se inhibira GSK-3 β (fosforilacijom serina 9) dovodeći do povećane ekspresije *IL10*. Primjenom LPS-a i inhibitora GSK-3 β u kulturi monocita došlo je do pojačane ekspresije *IL1B* i *IL6* te smanjene ekspresije *IL10*. Ovakav profil ekspresije citokina objasnili su molekularnim mehanizmom u kojem usljed inhibicije GSK-3 β kinaze dolazi do pojačane aktivnosti i vezanja CREB-a za CBP koaktivator koji je neophodan za optimalnu transkripcijsku aktivnost p65 podjedinice NF- κ B, čime se inhibira ekspresija gena proupalnih citokina. Pojačana aktivacija GSK-3 β fosforilacijom tirozina 216 je uočena u istraživanju Kim i sur. (2015) što je u uvjetima stresa ER-a posredovano IRE1- α kinaznom aktivnošću. Nasuprot tome Rao i sur. (2014) su determinirali ATF6 kao glavnog UPR senzora koji pojačava proupalno TLR signaliziranje pri stresu ER-a u Kupferovim stanicama i makrofagima. Pojačavanje proupalnog odgovora TLR-a ATF6 postiže inhibicijom Akt puta (kroz smanjenu fosforilaciju) i time ekspresije IL-10, te pojačavanjem aktivacije NF- κ B kroz inhibiciju oporavka I κ B. Pri stresu ER-a aktivaciju HSC-a mogu izazvati različiti mehanizmi posredovani PERK i IRE1- α granama UPR-a. PERK uzrokuje fosforilaciju regulatornog proteina, heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina A1 (engl. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*, HNRPN1) što vodi ka njegovoj degradaciji, remeti interakciju istog sa miR18A što uzrokuje povećanu ekspresiju SMAD2, TGF- β i drugih fibrogeničnih gena (Koo i sur. 2016). S druge strane moguć je i TGF- β -neovisan put aktivacije HSC-a, posredstvom XBP1 koji to postiže podstičući proces autofagije (Kim i sur. 2016).

Najveća eksprimiranost proupalnih citokina zabilježena je u kotretmanu tunikamicina i LPS-a i govori o sinergističkom djelovanju signalnih puteva stresa ER-a i TLR-a koje rezultira pojačavanjem proupalnog odgovora (Rao i sur. 2014; Ren i sur. 2014). Kako je jetra organ konstantno izložen LPS-u iz probavnog sustava, stres ER-a uzrokuje senzibilizaciju hepatocita na LPS, uzrokujući promjenu karaktera imunskog odgovora u korist upale. Rezultati ekspresije proupalnih citokina IL-1 β i IL-6 su u saglasnosti sa *in vivo* istraživanjima u kojima je stres ER-a također izazivan primjenom tunikamicina. Na koji način se mijenja ekspresija *IL10* u takvom modelu nije utvrđeno te je stoga to potrebno ispitati u daljnjim istraživanjima. Na osnovu rezultata istraživanja u kojima su korišteni drugačiji animalni modeli u kojima je također prisutan stres ER-a, utvrđeno je da uz pojačanu ekspresiju proupalnih citokina, opada ekspresija *IL10*. Sve veća pažnja je usmjerena na kinazu GSK-3 β

kao mogućeg centralnog regulatora ekspresije citokina i time njene uloge u povezivanju UPR-a i upalnog odgovora. To je konstitutivno aktivna kinaza čija aktivnost se može mijenjati neovisno, različitim mehanizmima. Stupanj aktivacije GSK-3 β ovisi o stupnju fosforiliranosti, gdje fosforilacija tirozina na poziciji 216 i 279 povećava, dok fosforilacija serina na poziciji 9 i 21 smanjuje njenu aktivnost (Robertson i sur. 2006). Najveća aktivacija GSK-3 β je također zabilježena pri kotretmanu tunikamicina i LPS-a (Ren i sur. 2014), te niz radova pokazuje da njena pojačana aktivnost uzrokuje smanjenje ekspresije gena protuupalnog IL-10, a pojačanje ekspresije gena proupalnih IL-1 β i IL-6. Spomenuta istraživanja ukazuju na mogućnost njene aktivacije direktnom kinaznom aktivnošću IRE1- α i inhibicijom Akt-a od strane ATF6 senzora u uvjetima stresa ER-a. Nasuprot tomu, Yamazaki i sur. (2009) su pokazali da ATF6 aktivira Akt put. Mogući uzrok oprečnosti rezultata jeste taj što su data *in vitro* istraživanja vršena na različitim tipovima stanica. U daljnjim istraživanjima potrebno je razjasniti molekularne mehanizme između ATF6 grane UPR-a i PI3K/Akt puta u *in vivo* modelu stresa ER-a jetre miša.

Zhang i sur. (2016) su utvrdili postojanje korelacije između pojačane aktivacije inflammasoma uzrokovane stresom ER-a i povećane proizvodnje lipogeničnih enzima i posljedično razvoja steatoze u jetri miša. Također su ustanovili da kod miševa *ob/ob* hepatično tkivo ispoljava stres ER-a, ima više prisutnog IL-1 β , tj. da pri steatozi dolazi do pojačane aktivacije inflammasoma. CHOP posreduje u regulaciji ekspresije kaspaza i time aktivacije inflammasoma te u ekspresiji proapoptotskih proteina Bax i Puma. Lebeaupin i sur. (2015) su u istraživanju sprovedenom na miševima *ob/ob* pokazali da tretman LPS-om kao i tunikamicinom povećava razinu markera stresa ER-a, upalu, aktivaciju inflammasoma i apoptozu/piroptozu hepatocita. Ti su rezultati pokazali da je stres ER-a mehanizam kojim se pojačavaju procesi upale, ozljede tkiva jetre što pogoduje progresiji bolesti u NASH. Stres ER-a uzrokuje i pojačava povećanje vezivnog tkiva putem različitih mehanizama. Aktivaciju glavnih efektor fibrogeneze, HSC, stres ER-a u jetri uzrokuje usljed povećane apoptoze i piroptoze hepatocita u čemu glavnu ulogu ima CHOP (Tamaki i sur., 2008; Lebeaupin i sur. 2015; Zhang i sur. 2016). Pored toga je ustanovljeno da se stres ER-a stvara u stelatnim stanicama jetre i da je dio procesa njihove aktivacije (Kim i sur. 2016; Koo i sur. 2016). Proupalni citokini IL-6 i IL-1 β uzrokuju povećanje ekspresije *CREBH*, transkripcijskog faktora specifičnog za jetru. Spada u CREB/ATF porodicu transkripcijskih faktora te se aktivira na sličan način kao i ATF6. Dosada nije jasno definiran način njegove aktivacije, ali je utvrđena njegova uloga u poticanju odgovora akutne faze u kojem aktivira transkripciju gena C-reaktivnog proteina (engl. *C-reactive protein*, CRP) i serumskog amiloidnog proteina

(engl. *serum amyloid protein*, SAP) u hepatocitima, doprinoseći razvoju sistemske upale (Zhang i sur. 2006; Wang i sur. 2016). Stres ER dakle pogađa hepatocyte kao i neparenhimalne stanice jetre i ima potencijal da uzrokuje promjene u metabolizmu lipida i uzrokuje statozu, upalu, ozljedu tkiva jetre te fibrozu jetre. To potvrđuje ulogu stresa ER-a u progresiji NAFLD.

6. ZAKLJUČCI

1. Metode detekcije specifičnih citokina su uspješno uspostavljene te su utvrđeni optimalni reakcijski uvjeti za detekciju *IL1B*, *IL6*, *IL10* te *TGFB* metodom qPCR.
2. Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze utvrdili smo da se u jetri miševa C57BL6N tretiranih 12 sati tunikamicinom koji je izazvao stres endoplazmatskog retikuluma mijenja ekspresija gena citokina IL-1 β , IL-6, IL-10.
3. Statistički značajno povećala se ekspresija *ILB* (5 puta) i *IL6* (49 puta), dok je *IL10* ekspresija bila statistički smanjena (0.5 puta).

7. POPIS LITERATURE

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Walter, P. (2008): Molecular biology of the cell. Taylor and Francis Group, New York.

Ali, A., Zhang, K. (2018): Endoplasmic reticulum stress response in nonalcoholic fatty liver disease. *Environmental disease*: **3**(2): 31-37.

Bustin, S. (2005): Real-Time PCR. U: Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics. New York, Marcus Dekker Inc, str. 1117-1125.

Chen, L., Ren, F., Zhang, H., Wen, T., Piao, Z., Zhou, L., Zheng, S., Zhang, J., Chen, Y., Han, Y., Duan, Z., Ma, Y. (2012): Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β ameliorates D-GalN/LPS-induced liver injury by reducing endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis. *Plos One*, **7**(9): e45202.

Couper, K. N., Blount, D. B., Riley, E. M. (2008): IL-10: the master regulator of immunity to infection. *The Journal of Immunology*, **180**:5771-5777.

Cyktor, J. C., Turner, J. (2011): Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infection and Immunity*, **79**(8):2964-2973.

Dara, L., Ji, C., Kaplowitz, N. (2011): The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology*, **53**(5): 1752-1763.

Dinarello, C.A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, **27**:519-50.

Foufelle, F., Fromenty, B. (2016): Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology Research and Perspectives*, **4**(1): e00211.

Gabay, C., Lamacchia, C., Palmer, G. (2010): IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, **6**:232-242.

Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., Agostinis, P. (2012): ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? *Trends in molecular medicine*, **18**(10): 589-596.

Gentile, C., Frye, M., Pagliassotti, M. J. (2011): Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, **15**(2): 505-521.

Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J., Blumberg, R. S. (2016): The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, **16**(8): 469-484.

Hayashi, H., Sakai, T. (2012): Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases. *Frontiers in Physiology*, **3**: 1-11.

Hetz, C., Chevet, E., Harding, H.P. (2013): Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature*, **12**:703-719.

Hutchins, A. P., Diez, D., Miranda-Saavedra, D. (2013): The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in Functional Genomics*, **12**(6): 489-498.

Iyer, S. S., Cheng, G. (2012): Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, **32**(1):23-63.

Kim, S., Joe, Y., Jeong, S. O., Zheng, M., Back, S. H., Park, S. W., Ryter, S. W., Chung, H. T. (2013): Endoplasmic reticulum stress is sufficient for the induction of IL-1 β production via activation of the NF- κ B and inflammasome pathways. *Innate Immunity*, **0**(0): 1-17.

Kim, S., Joe, Y., Kim, J. H., Kim, Y. S., Jeong, S., Pae, H. O., Ryter, S. W., Surh, Y. J., Chung, H. T. (2015): Endoplasmic reticulum stress-induced IRE1 α activation mediates cross-talk of GSK-3 β and XBP-1 to regulate inflammatory cytokine production. *The Journal of Immunology*, **194**: 4498-4506.

Kim, S. R., Hasegawa, D., Goosens, N., Tsuchida, T., Athwai, V., Sun, X., Robinson, C. L., Bhattacharya, D., Chou, H., Zhang, D. Y., Fuchs, B., C., Lee, Y., Hoshida, Y., Friedman, S. L. (2016): The XBP1 arm of the unfolded protein response induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *Scientific Reports*, **6**: 39342.

Kitamura, M. Biphasic, bidirectional regulation of NF- κ B by endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, **11**(9): 2353-2364.

Koo, J. H., Lee, H. J., Kim, W., Kim, S. G. (2015): Endoplasmic reticulum stress in hepatic stellate cells promotes liver fibrosis via PERK-mediated degradation of HNRNPA1 and upregulation of SMAD2. *Gastroenterology*,

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, Zorić, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**: 95-125.

Lebeaupin, C., Proics, E., de Bievill, C. H. D., Rousseau, D., Bonnafoous, S., Patouraux, S., Adam, G., Lavallard, V. J., Rovere, C., Le Thuc, O., Saint-Paul, M. C., Anty, R., Schneck, A. S., Iannell, A., Gugenheim, J., Tran, A., Gual, P., Bailly-Maitre, B. (2015): ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death and Disease*, **6**: e1879.

Lee, J-S., Zheng, Z., Mendez, R., Ha, S-W., Xie, Y., Zhang, K. (2012): Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett.*, **211**(1): 29-38.

Lerner, A. G., Upton, J-P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A., Papa, F. R. (2012): IRE1 α induces thioredoxi-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death during endoplasmic reticulum stress. *Cell Metabolism*, **16**(2): 250-264.

Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S., Michalek, S. M. (2005): Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunology*, **6**(8): 777-784.

Martinon, F., Glimcher, L. H. (2011): Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Immunology*, **23**: 35-40.

Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., Tschopp, J. (2012): ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death and Disease*, **3**: e261.

Murphy, K. P. (2012): *Janeway's immunobiology*. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.

Norris, C.A., He, M., Kang, L.-I., Ding, M.Q., Radder, J.E., Haynes, M.M., Yang, Y., Paranjpe, S., Bowen, W.C., Orr, A., Michalopoulos, G.K., Stolz, D.B., Mars, W.M. (2014): Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *Plos One*, **9**(4):1-14.

Osowski, C. M., Hara, T., O'Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L. J., Hayashi, E., Hui, S. T., Greiner, D., Kaufman, R. J., Bortell, R., Urano, F. (2012): Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metabolism*, **16**(2): 265-273.

Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. (2013): *Kuby Immunology*. W. H. Freeman and Company, New York.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**(9): e36.

Rao, J., Yue, S., Fu, Y., Zhu, J., Wang, X., Busuttil, R. W., Kupiec-Weglinski, J. W., Lu, L., Zhai, Y. (2014): ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR

activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury. *The American Society of Transplantation*, **14**: 1552-1561.

Ren, F., Zhou, L., Zhang, X., Wen, T., Shi, H., Hie, B., Li, Z., Chen, D., Wang, Z., Duan, Z. (2015): Endoplasmic reticulum stress-activated glycogen synthase kinase 3 β aggravates liver inflammation and hepatotoxicity in mice with acute liver failure. *Inflammation*, **38**: 1151-1165.

Rich, R. R., Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder, H. W., Frew, A. J., Weyand, C. M. (2008): *Clinical Immunology. Principles and practice*. Elsevier, Philadelphia.

Robertson, L. A., Kim, A. J., Werstuck, G. H. (2006): Mechanisms linking diabetes mellitus to the development of atherosclerosis: a role for endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **84**: 39–48.

Rutkowski, D.T., Hedge, R. S. (2010): Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *Journal of Cell Biology*, **189**:783-294.

Saraiva, M., O'Garra, A. (2010): The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature*, **10**:170-181.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1813**:878-888.

Schmidt-Arras, D., Rose-John, S. (2016): IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology*, **64**:1403-1415.

Tamaki, N., Hatano, E., Taura, K., Tada, M., Kodama, Y., Nitta, T., Iwaisako, K., Seo, S., Nakajima, A., Ikai, I., Uemoto, S. (2008): CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **294**: 498-505.

Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. (2014): IL-6 in inflammation, immunity and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**: a016295.

Travis, M. A., Sheppard, D. (2014): TGF- β activation and function in immunity. *Annual Review of Immunology*, **32**:51-82.

Walter, P., Ron, D. (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, **334**:1081-1086.

Wang, M., Zha, S., Tan, M. (2015): bZIP transmembrane transcription factor CREBH: potential role in non-alcoholic fatty liver disease (review). *Molecular Medicine Reports*, **13**: 1455-1462.

Wang, M., Kaufman, R. J. (2016): Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, **529**: 326-335.

Worthington, J. J., Fenton, T. M., Czajkowska, B. I., Klementowicz J. E., Travis, M. A. (2012): Regulation of TGF- β in the immune system: an emerging role for integrins and dendritic cells. *Immunobiology*, **217**:1259-1265.

Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Johnson, C. D., Canbay, A., Hoffman, H. M., Feldstein, A. E. (2014): NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*, **59**(3): 898-910.

Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Kunihiro, H., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A. W., Paton, J. C., Kitamura, M.(2009): Activation of the Akt-NF- κ B pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol*, **183**: 1480-1487.

Yang, L., Seok Roh, Y., Song, J., Zhang, B., Liu, C., Loomba, R., Seki, E. (2014): Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology*, **59**(2): 483-495.

Yin Liu, C., Kaufman, R.J. (2003): The unfolded protein response. *Journal of Cell Science*, **116**:1861-1862.

Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Ruutkowski, T., Back, S. H., Kaufman, R. (2006): Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, **124**: 587-599.

Zhang, K., Kaufman, R.J (2008): From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, **454**:455-462.

Zhang, J., Zhang, K., Li, Z., Guo, B. (2016): ER stress-induced inflammasome activation contributes to hepatic inflammation and steatosis. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, **7**(5): 1000457.

Internetske stranice:

<https://www.idtdna.com/pages>

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. studenog 1991. godine u Bihaću. Maturirala sam 2010. na u Općoj Gimnaziji Bihać i iste godine upisala 1. godinu preddiplomskog studija biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Sarajevu. Tijekom preddiplomskog studija bila sam član Društva studenata biologije u BiH u okviru kojeg sam prisustvovala na internacionalnim kampovima u svrhu istraživanja biodiverziteta. Zvanje sveučilišnog prvostupnika stekla sam 2016. godine nakon čega sam upisala smjer eksperimentalne biologije, modul fiziologija i imunologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.